Gentherapeutischer Einsatz von membranständigen Tumornekrosefaktor-exprimierenden retroviralen Vektoren am Modell des Meth-A-Sarkoms und des B16-Melanoms *in vivo*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Chinedu Ulrich Ebenebe aus Zaria in Nigeria

> > Gießen 2004

Aus dem Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung Bad Nauheim Abteilung für molekulare Zellbiologie Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. W. Schaper

Gutachter: Prof. Dr. M. Clauss

Gutachter: Prof. Dr. H. Pralle

Tag der Disputation: 18.04.2005

1	EINLEITUNG	1
11	TUMORRIOLOCISCHE CRUNDLACEN	1
111	MECHANISMEN DER TUMORENTSTEHLING	•••••• 1
112	ANGIOGENESE	
1112	DAS BLUTGEFÄRSYSTEM DES TUMORS	2
111.5	DIE BEDEUTUNG DES TUMORENDOTHELS FÜR DIE TUMORTHERAPIE	2
115	DAS AKTIVIERTE TUMORENDOTHEL	5
1.2	TUMORNEKROSEFAKTOR-A UND DAS METH-A-SARKOM	6
1.3	TUMORTHERAPIE	9
131	THERAPIE SOLIDER TUMOREN	9
1.3.2	TNF-A IN DER TUMORTHERAPIE	10
1.3.3	NEUE STRATEGIEN IN DER TUMORTHERAPIE MIT TNF-A	10
1111	Isolierte Extremitätenperfusion	11
1.3.3.2	Retrovirale Gentherapie	11
1.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	12
2	MATERIAL UND METHODEN	12
<u> </u>	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	GERÄTE	13
2.2	CHEMIKALIEN	14
2.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	15
2.3.1	STANDARDLÖSUNGEN UND –MEDIEN FÜR DIE GEWEBEKULTUR	15
2.3.2	VERWENDETE ZELLLINIEN UND KULTURMEDIEN	16
2.3.3	KULTIVIEREN VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN	17
2.3.4	LANGZEITLAGERUNG VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN	17
2.3.5	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	17
2.4	ISOLATION UND KONZENTRATION RETROVIRALER VEKTOREN	18
2.4.1	ISOLATION UND KONZENTRIERUNG VON RETROVIREN NACH CONSTANCE CEPKO	18
2.4.2	ISOLATION UND KONZENTRIERUNG VON RETROVIREN NACH NEIL E. BOWLES	18
2.4.3	BESTIMMUNG DES VIRUSTITERS	18
2.5	HISTOLOGIE	19
2.5.1	HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTEN	19
2.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten	19
2.6	IMMUNPROTEINCHEMIE	20
2.6.1	STANDARDLÖSUNGEN FÜR DIE PROTEINBIOCHEMIE UND DIE IMMUNHISTOLOGIE	20
2.6.2	Immunfluoreszenz-Färbung	20
2.7	MORPHOLOGISCHE AUSWERTUNG VON GEWEBESCHNITTEN	22
2.7.1	BESTIMMUNG DER KAPILLARDICHTE IN GEWEBESCHNITTEN	22
2.7.2	BESTIMMUNG DES GEFÄBANTEILS IN GEWEBESCHNITTEN	22
2.7.3	BESTIMMUNG DES NEKROSEANTEILS IN GEWEBESCHNITTEN	22
2.8	IN VITRO STUDIEN ZUR BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT	23
2.8.1	Gerinnungstest	23
2.9	EXPERIMENTE AM TIERMODELL	24
2.9.1	SUBKUTANE IMPLANTATION VON TUMORZELLEN UND INTRATUMORALE BZW.	
	INTRAPERITONEALE INJEKTION VON LÖSUNGEN	24
2.9.2	ISOLIERUNG VON TUMORGEWEBE	24

3	ERGEBNISSE	<u> 25</u>
2.1	IN MEDIC ANALMED DED CDE - E96 7ELLM ONE	25
3.1	IN VITRO-ANALYSE DER GLE TE ANGEIZIERTE CD E% ZELLEN DIDUZIERTE EXPRESSION VC	23
3.1.1	ANALYSE DER DURCH TRANSFIZIERTE OF TE 60-ZELLEN INDUZIERTE EXPRESSION VO TUSSUE EA GTOD	25
212	DEGTER A UNIC DEG DET DOMENTEN TITEDO	25
3.1.2	DESTIMMUNG DES RETRUVIRALEN TITERS	27 20
3.2 3.2	ISOLATION UND KUNZENTRIERUNG VON KETROVIREN	20
3.3	IN VIVO-I UMOREAPERIMENTE Tumodumetik deim Metil A Sadkom	30 20
3.3.1	Ι υμορκινετικ δείμι μετη-α-sarkom Ιντρατιμοραί ε Ινιεντίον νον τμΤΝΕ ενδιμιεδενδική Βετρονίδεν ιν Μετμ	50 A
5.5.2	SADVOME	3/
333	INTRATIMORALE INJEKTION VON TMTNF-EXPRIMIERENDEN RETROVIREN IN METH-	Δ_
5.5.5	SARKOME MIT ANSCHI JEBENDER INTRATIMORALEN INJEKTION VON STNF	36
334	INTRATIMORALE INJECTION VON TATINE SARRON VON STATI	Δ_
5.5.1	SARKOME MIT ANSCHI JEBENDER INTRAPERITONEAL EN INJEKTION VON STNF	39
335	INTRATIMORALE INJEKTION VON TMTNF-EXPRIMIERENDEN RETROVIREN IN B16-	
5.5.5	MELANOME	42
336	INTRATUMORALE INJEKTION VON TMTNF-EXPRIMIERENDEN RETROVIREN IN B16-	
0.0.0	MELANOME MIT ANSCHLIEBENDER INTRAPERITONEALEN INJEKTION VON STNF	46
3.3.7	DOSIS-ABHÄNGIGE WIRKUNG VON MELPHALAN AUF DAS METH-A-SARKOM	49
338	INTRATUMORALE INJEKTION VON TMTNF-EXPRIMIERENDEN RETROVIREN IN METH-	A-
0.0.0	SARKOME MIT ANSCHLIEßENDER INTRAPERITONEALEN INJEKTION VON MELPHALAN	51
4	DISKUSSION	51
<u> </u>	DISKUSSION	34
4.1	TNF-A ALS ANTINEOPLASTISCHE SUBSTANZ	54
4.2	KLONIERUNG DER CDNA VON MURINEM MEMBRANSTANDIGEN TNF-A	55
4.3	IN VITRO-ANALYSE DER TRANSFIZIERTEN GP+E86-ZELLKLONE	57
4.3.1	I NF-INDUZIERTE ENDOTHELIALE GERINNUNGSAKTIVITAT	57
4.3.2	EXPRESSION RETROVIRALER VEKTOREN	5/
4.3.3	EKHOHUNG DES RETROVIKALEN TITEKS	38
4.4	RETROVIRALE GENTHERAPIE MIT IMINF	39 50
4.4.1	KETROVIKALE INFEKTION VON TUMOK- UND ENDOTHELZELLEN	39
4.4.2	EINFLUSS DEK KETKOVIKALEN GENTHEKAPIE MIT IMTINF AUF DIE TUMODVASKUU ADISIEDUNG	61
112	I UMORVASKULARISIEKUNG	01
4.4.3	EINFLUSS DER KETROVIKALEN GENTHERAPIE MIT IMTINF AUF DIE AUSBILDUNG VOR TUMODNERDOSEN	62
111	I UMOKNEKKOSEN	05 1 a Ni
4.4.4	LINFLUSS DER RETROVIRALEN GENTHERAPIE MIT IMTINI KOMBINIERT MIT MELPHA	LAN 64
15	AUF DAS TUMUKWACHSTUM	04
4.5	DIE DEDEUTUNG DER GENTHERAPIE IN DER DEHANDLUNG VON TUMOREN	00
_		
5	ZUSAMMENFASSUNG	<u> 68</u>
6	SUMMARY	60
5		
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	70

8	LITERATURVERZEICHNIS	
9	ANHANG	
9.1	DANKSAGUNG	
9.2	LEBENSLAUF	
9.3	Eidesstattliche Erklärung	

1 Einleitung

1.1 Tumorbiologische Grundlagen

1.1.1 Mechanismen der Tumorentstehung

Der Gebrauch des Begriffs "Tumor" geht auf Hippocrates und Galen im Sinne einer entzündlichen Schwellung zurück. Heutzutage versteht man unter einem Tumor jedoch weniger ein Entzündungszeichen als vielmehr eine Schwellung auf dem Boden einer Neoplasie.

Der Prozess der Transformation normaler Zellen in maligne Krebszellen wird als Karzinogenese bezeichnet. In der Regel handelt es sich dabei um eine Serie somatischer Mutationen in unterschiedlichen Genen, die über mehrere Jahre hinweg kumulieren (Nowell, 1976; Frisch, 1994). Durch gewisse toxische Faktoren ausgelöst, kann dieser Prozess jedoch beschleunigt sein. Die resultierende autonome Zellregulation und klonales neoplastisches Wachstum können entweder Folge einer Inaktivierung und Suppression von Tumorsuppressorgenen oder einer Aktivierung und Überexpression von Onkogenen sein (Weinberg, 1996). Hierzu kommt es durch fortschreitende Veränderungen des Genoms durch Punktmutationen, chromosomale Translokation oder Amplifikation von Genabschnitten. Zellfunktionen und -teilung erfolgen dann losgelöst von einer übergeordneten Regulation, was zu einem unregulierten neoplastischen Wachstum führt. Prognostisch entscheidend im Prozess der Entstehung von Krebs ist die Initiation von lokaler Invasion und tumorinduzierter Neovaskularisation als Voraussetzung für das Metastasieren von Tumorzellen. Die Invasion ist gekennzeichnet durch lokale Proteolyse, zelluläre Adhäsion sowie Migration und ist eine aktive Bewegung von neoplastischen Zellen über Gewebebarrieren und extrazelluläre Matrix hinaus. Um Metastasen bilden zu können, müssen die verschleppten Tumorzellen die lokalen und systemischen Abwehrmechanismen an einem vom Primärtumor entferntem Ort überwinden.

Man geht bei der Krebsentstehung von einem Mehrstufenkonzept aus. Der Initiations- und Promotionsstufe folgt dabei in der Regel, jedoch nicht zwingend, die Immortalisierung. In der Initiationsstufe verursacht ein physikalisches, chemisches oder biologisches Agens eine Veränderung in der molekularen Struktur der zellulären DNS. Diesem molekularen Schaden folgt die Promotionsstufe, in der die Expression derjenigen Gene, die bei der Proliferation und Differenzierung der Zelle mitwirken, moduliert wird. Als Immortalisieung wird der Übergang von einem benignen in einen malignen Tumor bezeichnet.

1.1.2 Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man die Aussprossung neuer Kapillaren aus vorbestehenden Blutgefäßen. Physiologischerweise schließt die Angiogenese im jungen Erwachsenenalter ab. Im gesunden Erwachsenen findet sie sich dann nur noch während des Menstruationszykluses im Endometrium und in den Ovarien, während Wundheilung und während Entzündungsvorgängen. Angiogenese kann jedoch auch in einigen pathologischen Prozessen wie der rheumatoiden Arthritis, der diabetischen Retinopathie und Tumorerkrankungen stattfinden (Folkman, 1985).

Bei der Bildung neuer Blutgefäße spielen viele Zellen eine wichtige Rolle, indem sie lösliche angiogenesefördernde bzw. -hemmende Moleküle sezernieren (Koch, Cho et al., 1992), wobei noch nicht ganz klar ist, wie diese Effektorzellen aktiviert werden. Hypoxie, die aus der insuffizienten Blutversorgung resultiert, ist ein wichtiger auslösender Faktor von Angiogenese (Shweiki, Itin et al., 1992; Plate, Breier et al., 1993).

Es gibt eine ganze Auswahl von Angiogeneseinduktoren, die man in drei Gruppen einteilen kann (Klagsbrun und Moses, 1999). Die Erste Klasse besteht aus der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) -Familie und den Angiopoietinen, die spezifisch an Endothelzellen binden. Zu der zweiten Klasse gehören meist direkt wirkende Moleküle wie einige Zytokine, Chemokine (Moore, Keane et al., 1998) und angiogenesefördernde Enzyme (Brown und Giaccia, 1998; Chiarugi, Magnelli et al., 1998), die neben Endothelzellen eine große Spannbreite anderer Zielzellen aktivieren. Das bekannteste Mitglied dieser Gruppe, der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2), war einer der ersten angiogenen Peptide, die charakterisiert wurden. Die dritte Gruppe der Angiogenese-Moleküle schließt indirekt wirkende Faktoren ein, deren Effekt auf Angiogenese durch die Freisetzung direkt wirkender Moleküle durch Makrophagen, Endothelzellen und Tumorzellen erfolgt. Am besten *Tumornekrosefaktor-α* $(TNF-\alpha)$ untersucht sind der und der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β), welche endotheliale Zellproliferation in vitro hemmen. In vivo induziert TGF-β Angiogenese und stimuliert die Expression von TNF-α, FGF-2, PDGF (thrombozytärer Wachstumsfaktor) und VEGF durch angelockte Entzündungszellen (Falcone, McCaffrey et al., 1993; Pintavorn und Ballermann, 1997).

1.1.3 Das Blutgefäßsystem des Tumors

Erreicht ein Tumor einen Durchmesser von etwa 100 – 200 µm stellt sich, bedingt durch den Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff, in der Tumorperipherie (Gasparini, Toi et al., 1999)

ein Gleichgewicht ein, bei dem die Anzahl der proliferierenden Tumorzellen und die der absterbenden Zellen sich die Waage halten. In-situ-Karzinome können auf diese Art und Weise schlafend und unentdeckt bis zu mehrere Jahre existieren ohne zu metastasieren (Folkman, 1995). Nach einigen Monaten oder Jahren kann sich der Tumor durch Induktion der Formierung von Kapillaren in einen angiogenen Phänotyp umwandeln und beginnen, das umliegende Gewebe zu infiltrieren. Dieser "angiogenic switch" wird durch das Zusammenspiel angiogenesehemmender und -fördernder Faktoren im Tumor reguliert. So kann der angiogene Phänotyp aus einer vermehrten Produktion angiogenesefördernder Faktoren durch die Tumorzellen, wie FGF-2 und VEGF, und/oder durch eine Herabregulierung negativer Modulatoren, wie Thrombospondin-1 (TSP-1), in Gewebe mit schwacher Durchblutung resultieren (Pepper, 1997). Wie bei der physiologischen Angiogenese ist auch bei der tumorinduzierten Angiogenese Hypoxie die wichtigste Antriebskraft für die Bildung neuer Gefäße. Sie induziert die Expression von VEGF und dessen Rezeptor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1a (HIF-1a) (Jiang, Huang et al., 1997; Carmeliet, Moons et al., 1998). Andere Faktoren wie Angiopoietine und Plättchen-vermittelte Wachstumsfaktoren (PDGFs) rekrutieren Stützzellen wie Perizyten und glatte Muskelzellen, die während der Reifung der neuen Gefäße die gebildeten Endotheltunnel umgeben.

Tumorgefäße unterscheiden sich strukturell und funktionell von normalen Gefäßen. Sie sind geschlängelt und erweitert mit unregelmäßigem Durchmesser, starken Verästelungen und vielen Kurzschlüssen (Jain, Koenig et al., 1996; Hashizume, Baluk et al., 2000). Auch bezogen auf ihre Ultrastruktur sind Tumorgefäße anormal. Ihre Wände weisen zahlreiche endotheliale Fenster auf und die Basalmembran ist irregulär oder nicht vorhanden. Tumorendothelzellen sind ebenfalls unnormal in ihrer Form. Sie wachsen übereinander und ragen in das Gefäßlumen hinein (Hobbs, Monsky et al., 1998; Dvorak, Nagy et al., 1999; Hashizume, Baluk et al., 2000), was zur Folge hat, dass der Tumorblutfluss chaotisch ist (Baish und Jain, 2000). Dies führt oft zu einer Unterversorgung einiger Tumorabschnitte mit nachfolgender Nekrose (Helmlinger, Yuan et al., 1997).

Klinische Studien, die den Zusammenhang zwischen Tumorangiogenese und Prognose werteten, untermauern die Relevanz von Neovaskularisierung für die Tumorbiologie. Beim invasiven Brustkarzinom korrelieren die Metastasierung zu lokalen Lymphknoten und Fernmetastasierung (Weidner, Semple et al., 1991) stark mit der Dichte der Tumormikrogefäße (Horak, Leek et al., 1992). Auch findet man erhöhte Werte des Angiogenesefaktors FGF im Urin von Patienten verschiedener Tumorrekrankungen (Nguyen, Lehr et al., 1993). Eine derartige Bewertung der Ausdehnung der Tumorneovaskularisierung

durch nicht-invasive Laboruntersuchungen erlaubt die Frühe Erkennung von Tumoren und die Überwachung der Therapie (Nguyen, Lehr et al., 1993).

1.1.4 Die Bedeutung des Tumorendothels für die Tumortherapie

In den Siebzigern und den frühen Achtzigern machten Folkman und Denekamp auf die Bedeutung der Blutversorgung für das Tumorwachstum aufmerksam und auf die Möglichkeit, dies für die Tumortherapie auszunutzen (Folkman, 1972; Denekamp, 1984). Da Tumorendothelzellen vom Blut aus leichter zugänglich sind, stellen sie einen viel attraktiveren Angriffspunkt für die spezifische Gabe von Therapeutika dar als die Tumorzellen selbst. Obwohl die Permeabilität der Tumorgefäße verglichen mit normalen Gefäßen gesteigert ist, sind nicht alle Tumorgefäße undicht. Auch erweisen sich die Tumorgefäßwände und der hohe interstitielle Flüssigkeitsdruck innerhalb des Tumorgewebes als eine wesentliche Barriere für den Transport gegen Tumorzellen gerichteter Therapeutika (Jain, 1997; Molema, de Leij et al., 1997). Ferner sind Tumorendothelzellen ein sinniges Ziel, da das Wachstum und das Überleben der Tumorzellen von einer intakten Blutversorgung abhängen. Während Tumorzellen genetisch instabil sind, ständig mutieren und in der Lage sind Resistenzen gegenüber Zytostatika auszubilden, sind Endothelzellen genetisch stabil und entwickeln nur selten Resistenzen gegenüber Therapeutika (Folkman, 1997).

Für eine wirksame Antiangiogenese-Therapie benötigt man Antikörper, die an Zelloberflächenmarker binden, die entweder spezifisch für Tumorendothelzellen sind oder auf diesen vermehrt exprimiert werden. Potentielle Zielmoleküle sind dabei das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, E-Selektin und VEGF- und Tie-Rezeptoren. In einer Studie konnte spezifisch die Proliferation von *fetaler Leber-Kinase-1* (Flk-1)-positiven Endothelzellen *in vitro* und die Angiogenese *in vivo* durch chemisch an ein Diphterietoxinmolekül (DT385) gebundenes VEGF gehemmt werden (Arora, Masood et al., 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Modulation von Tumorangiogenese ist die Gentherapie. Damit kann eine anhaltende therapeutische Freisetzung von aktiven Substanzen erzielt werden. Zum Beispiel hat man adenovirale und retrovirale Vektoren, dessen cDNS für Angiostatin (Tanaka, Takahashi et al., 1998) oder den *Plättchenfaktor-4* (PF-4) (Tanaka, Cao et al., 1998) oder Antisense-VEGF (Im, Gomez-Manzano et al., 1999) kodierten, eingesetzt, um Endothelzellwachstum *in vitro* und Angiogenese und Tumorwachstum *in vivo* zu hemmen.

1.1.5 Das aktivierte Tumorendothel

Das Gefäßendothel ist nicht nur eine passive Auskleidung von Blutgefäßen ohne metabolische Aktivität, sondern ist aktiv an Entzündungsreaktionen und Thrombosierung beteiligt. Endothelzellen sind sowohl Quelle wie auch Ziel verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Änderungen in der Funktion des Endothels verursachen. Diese funktionelle Reprogrammierung, die man als Aktivierung des Endothels bezeichnet, findet nicht nur in Entzündungs- und Gerinnungssituationen, sondern auch während Angiogenese statt (Mantovani, Bottazzi et al., 1992).

Der Grundzustand von Endothelzellen wird als antikoagulatorisch angesehen, d.h. dass intrinsischer und extrinsischer Gerinnungsweg inaktiviert sind. Durch die klassischen proinflammatorischen Zytokine TNF und Interleukin-1 (IL-1) durchlaufen Endothelzellen eine ausgeprägte phänotypische Veränderung und können die Entstehung von Thromben und Entzündungen begünstigen. Zusätzlich besitzen Endothelzellen aktive gerinnungshemmende Mechanismen, indem sie Thrombomodulin an ihrer Oberfläche exprimieren und Protein S sezernieren, wodurch die aktivierte Protein C-Kaskade katalysiert wird (Stern, 1986). TNF und IL-1 können die antikoagulatorische Beschaffenheit des Endothels reduzieren, indem sie Thrombomodulin herabregulieren (Lentz, McKean et al., 1989; Moore, Esmon et al., 1989) und/oder die Bildung von Gewebsthromboplastin induzieren, der als Initiator des extrinsischen Gerinnungsweges in ruhendem Endothel abwesend ist (Nawroth, Bank et al., 1986; Nawroth und Stern, 1986). Bei der Modifikation von Gefäßtonus und -permeabilität spielt auch die Aktivierung der Endothelzellen durch Thrombin, Histamin, VEGF und proinflammatorischen Zvtokinen eine Rolle. Diese Mediatoren die setzen Endothelbarrierefunktion in vitro und in vivo herab, was zu einer Extravasation von Plasmaanteilen wie Fibrinogen und Fibronektin führt (Senger, Galli et al., 1983; Yi und Ulich, 1992; Worrall, Chang et al., 1997).

Eine Hauptwirkung von Zytokinen auf die Endothelfunktion ist die Zunahme der Leukozytenadhäsion und -transmigration. Endothelzellen sind durch das Sezernieren von Signalstoffen, die Exprimierung von Adhäsionsmolekülen und das Variieren des Blutflusses an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt. Durch Induktion von Oberflächenexpression von Bindungssmolekülen bringen TNF und IL-1 eine normalerweise eher inaktive Endotheloberfläche dazu. adhäsiv für Leukozyten sein. Zu diesen zu Transmembranmolekülen gehören P- und E-Selektin, die zu Leukozytenrollen führen und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), die eine stärkere Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel bewirken und für die Transmigration bedeutend sind (Springer, Desai et al., 1994). Ferner lösen TNF und IL-1 die Freisetzung von Chemokinen wie das *Monozyten-attrahierende Protein-1* (MCP-1) oder das Neutrophile anlockende *Interleukin-8* (IL-8) aus (Mantovani, Sozzani et al., 1997). Chemokine erleichtern Leukozyten die Transmigration durch das Endothel vermutlich nicht nur durch ihre chemotaktische Aktivität, sondern auch durch die Fähigkeit die Affinität der Leukozytenintegrine zu ihren Endothelliganden zu erhöhen (Smyth, Mossman et al., 1994; Weber, 1996).

Das aktivierte Endothel führt in Tumoren zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität (Dvorak, Nagy et al., 1992) und zur Bildung des prokoagulativ wirkenden *tissue factors* (Gewebsthromboplastin) (Contrino, Hair et al., 1996) und einiger Adhäsionsproteine wie E-Selektin und VCAM-1 (Renard, Lafage-Pochitaloff et al., 1996; Ogawa, Umehara et al., 1999).

1.2 Tumornekrosefaktor-α und das Meth-A-Sarkom

1975 entdeckten Carswell et al., dass Serum, das von Mäusen gewonnen wurde, die sequentiell mit einem starken Aktivator des mononuklearen phagozytären Systems und Endotoxins behandelt wurden, in soliden Tumoren Nekrose und Tumorregression induzieren konnte. So entstand der Begriff *Tumornekroseserum* (TNS). Aus TNS konnte ein Faktor isoliert werden, dem alleine man die tumornekrotisierende Komponente zusprach und der deshalb *Tumornekrosefaktor* (TNF) genannt wurde. Obwohl TNF ursprünglich als Nekrose induzierend beschrieben wurde, scheint in einigen Fällen die Induktion der Apoptose (programmierter Zelltod) bei der Tumorregression eine wichtigere Rolle zu spielen.

TNF- α (*Kachektin*) und TNF- β (*Lymphotoxin*) gehören zu einer Familie sezernierter Proteinen und Zelloberflächenproteinen, die auf die Induktion immunologischer und inflammatorischer Vorgänge einen Einfluss haben (Pujo-Borell et al., 1987). TNF- α spielt bei verschiedenen pathologischen Vorgängen wie septisch-toxischer Schock (Tracy und Black, 1987)), Kachexie (Beutler, Milsark et al., 1985), erworbenes Immundefektsyndrom (AIDS) (Duh, Maury et al., 1989) und der Pathogenese einiger autoimmuner Erkrankungen (Pujo-Borell et al., 1987) eine entscheidende Rolle.

TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet (Carswell, Old et al., 1975). Dabei wird das membranständige Vorläufermolekül (tmTNF) mit einem Molekulargewicht von 26 kD mit Hilfe einer spezifischen Metalloproteinase (*TNF-\alpha*- *konvertierendes Enzym*, TACE) durch proteolytische Abspaltung des C-terminalen Endes in die lösliche Form (sTNF) mit einem Molekulargewicht von 17 kD (157 Aminosäuren) überführt (Pennica, Nedwin et al., 1984; Aggarwal, Kohr et al., 1985).

Während das lösliche TNF-Protein für die systemischen Effekte verantwortlich gemacht wird, ist die membranständige Form in der Lage, im direkten Kontakt zweier Zellen zu wirken (Perez, Albert et al., 1990). Sowohl lösliche als auch membranständige TNF-Proteine sind Homotrimere (Wingfield, Pain et al., 1987; Schoenfeld, Poeschl et al., 1991) mit drei TNF-Rezeptor-Bindungsstellen (Van Ostade, Van der Heyden et al., 1999).

Es sind zwei unterschiedliche TNF-Rezeptoren beschrieben, die für die biologische Aktivität von TNF verantwortlich sind: der TNF-Rezeptor I (TNF-RI) mit einem relativen Molekulargewicht von 55-60 kD und der 75-80 kD große TNF-Rezeptor II (TNF-RII) (Loetscher, Schlaeger et al., 1990; Smith, Davis et al., 1990; Goodwin, Anderson et al., 1991; Lewis, Tartaglia et al., 1991). Beide TNF-Rezeptoren werden unabhängig von einander auf der Zellmembran praktisch aller somatischer Zellen exprimiert. Die extrazellulären Anteile von TNF-RI und TNF-RII sind zu 28 % identisch, wohingegen die intrazellulären Komponenten keinerlei Homologie aufweisen (Camerini, Walz et al., 1991; Itoh, Kohgo et al., 1991). Dies führt zu unterschiedlicher zellulären Antwort bei Aktivierung der beiden Rezeptoren (Dembic, Loetscher et al., 1990). TNF-RI besitzt ein konserviertes zytoplasmatisches Signalmotiv, dessen Aktivierung in der Zelle zu Apoptose führt. Dieses Signalmotiv wird deshalb als "Todesdomäne" bezeichnet (Tartaglia, Rothe et al., 1993). Obwohl TNF-RII diese Domäne nicht besitzt, wurde auch bei Stimulation dieses Rezeptors die Induktion von Apoptose beobachtet (Heller, Song et al., 1992). Wahrscheinlich wird hierbei durch die Stimulation des TNF-RII die Bildung von TNF induziert, welches dann autokrin oder parakrin über den TNF-RI Apoptose induziert (Grell, Zimmermann et al., 1999).

Die Aktivierung von TNF-RI bzw. TNF-RII durch TNF- α induziert eine Oligomerisation des Rezeptors und eine Rekrutierung mehrerer Signalproteine zu ihren zytoplasmatischen Domänen (Hsu, Xiong et al., 1995; Hsu, Huang et al., 1996). Unter den klassischen Transkriptionsfaktoren, die von TNF- α aktiviert werden, spielt der *nukleare Faktor* κB (NF κ B) die wichtigste spezifische Rolle in der Regulation von Entzündungsgenen (Pahl and Baeuerle, 1996; Barnes, Haddad et al., 1997). Tartaglia et al. (1993a; 1993b) zeigten, dass tmTNF- α gegenüber sTNF- α in verschiedenen Systemen wie auch der T-Zell-Aktivierung der stärkere Aktivator des TNF-RII ist (Decoster, Vanhaesebroeck et al., 1995; Grell, Douni et al., 1995). In unserer Arbeitsgruppe wurde tmTNF- α im Tumorendothel des Meth-A-Sarkoms der Maus detektiert (Clauss, Sunderkotter et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das in Endothelzellen von Sarkomen gebildete tmTNF- α -Protein für die VEGF induzierte Gefäßhyperpermeabilität absolut notwendig ist. So war in Abwesenheit von tmTNF- α (durch Neutralisation mittels eines Antikörpers oder in TNF-*knock-out*-Mäusen) VEGF nicht in der Lage, die Gefäßpermeabilität zu erhöhen (Clauss, Sunderkotter et al., 2001). Die Funktion von TNF- α in Endothelzellen bestand hier in einer Voraktivierung des Endothels, welche die Wirkung des VEGFs in Bezug auf die Permeabilität erst ermöglichte.

Das *Methylcholanthren A* (Meth A) induzierte Sarkom wurde in Mäusen vielfach als Model verwendet, um durch LPS (Carswell et al., 1975) und TNF- α (Van de Wiel, Bloksma et al., 1989) induzierte hämorrhagische Nekrosen zu studieren. Dieser experimentelle Tumor zeichnet sich durch seine gute Therapierbarkeit mit löslichem TNF, eine erhöhte Gefäßpermeabilität und ein aktiviertes Tumorendothel aus (Watanabe, Nütsu et al., 1988; Van de Weil, Bloksma et al., 1989). Etwa eine Woche nach subkutaner Inokulation des Tumors ist eine einzelne Injektion von TNF- α (2 µg i.p. oder i.t.) ausreichend, um innerhalb weniger Tage eine hämorrhagische Nekrose gefolgt von völliger Tumorregression hervorzurufen. Dabei werden intravasale Fibrinablagerungen beobachtet, die sich zu verschließenden Thrombosen in den Tumorgefäßen, jedoch nicht in normalen Gefäßen, entwickeln (Nawroth, Handley et al., 1988). Da TNF- α primär auf das Tumorgefäßsystem wirkt (Kawai, Satomi et al., 1987; Palladino, Patton et al., 1987; Manda, Shimomura et al., 1987; Tomazic, Farha et al., 1988; North und Havell 1988; Van de Weil, Bloksma et al., 1989) sind Meth-A-Sarkomzellen *in vitro* TNF- α gegenüber weitgehend resistent (Creasey, Reynolds et al., 1986).

Aus dem Überstand von Meth-A-Sarkomzellen konnten drei verschiedene Polypeptide isoliert werden, die in der Lage sind, die Expression von Gewebsthromboplastin im Endothel zu induzieren und die prokoagulatorische Aktivität dieser Zellen durch TNF- α zu verstärken: VEGF, das endotheliale Monozyten-aktivierende Polypeptid-1 (EMAP I) und EMAP II (Clauss, Gerlach et al., 1990; Clauss, Murray et al., 1990; Kao, Ryan et al., 1992; Kao, Houck et al., 1994, Marvin, Libutti et al., 1996). Es scheint, dass vom Tumor stammende Faktoren das Tumorendothel für TNF-a sensibilisieren können und dadurch an der selektiven Beschädigung der Tumorgefäße beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wurde vor einigen VEGF TNF-α die Jahren gezeigt, dass und Expression von endothelialem Gewebsthromboplastin synergistisch induzieren (Clauss, Grell et al., 1996). Zahlreiche Studien demonstrierten, dass T-Zellen beim antitumoralen Effekt von TNF-α eine wichtige Rolle spielen. So konnten in Meth A Tumoren-tragenden athymischen Mäusen keine TNF-α induzierte Regression der Sarkome nachgewiesen werden und auch Tumoren in Nacktmäusen zeigten nach TNF- α -Behandlung weniger ausgeprägte hämorrhagische Nekrosen verglichen mit immunkompetenten Tieren (Haranaka, Satomi et al., 1984). Bei Mäusen, die durch TNF- α -Gabe von Meth-A-Sarkomen geheilt wurden, beobachtete man die Entwicklung einer spezifischen T-Zell-induzierten Immunantwort (Palladino, Patton et al., 1987).

1.3 Tumortherapie

1.3.1 Therapie solider Tumoren

Die wichtigsten Behandlungsmethoden bei Tumorerkrankungen sind der chirurgische Eingriff, die Radiotherapie und die Chemotherapie. Je nach Krebsform und Behandlungsziel können die Behandlungsmöglichkeiten einzeln oder kombiniert eingesetzt werden.

Bis heute ist die Chirurgie die am häufigsten angewandte Methode zur Behandlung von Krebs. Dabei wird der Tumor wenn möglich zusammen mit einem umgebenden Bereich von gesundem Gewebe entfernt, um möglichst sicher zu sein, dass keine Tumorreste zurückbleiben. Wenn ein Tumor vollständig und mit ausreichendem Sicherheitsabstand entfernt wird bevor es zur Metastasierung kommt, kann die Erkrankung damit geheilt sein. Bei vielen Tumorerkrankungen wird jedoch sicherheitshalber eine Nachbehandlung (z.B. Strahlen- oder Chemotherapie) durchgeführt, um zu vermeiden, dass einzelne, verbliebene Tumorzellen später zu einem Rückfall der Tumorerkrankung führen.

Eine weitere wichtige Therapiemethode bösartiger Erkrankungen ist die Strahlentherapie. Hierbei verwendet man energiereiche Formen der elektromagnetischen Strahlung und Teilchenstrahlung. An den durchstrahlten Körperbereich wird durch die Strahlung Energie abgegeben, was zu somatischen Veränderungen in den Zellen führt. Wesentlich für die Wirkung der Strahlentherapie sind vor allem Schädigungen der DNS im Zellkern. Oftmals werden die Bestrahlungen gut vertragen, manchmal können jedoch unangenehme Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Müdigkeit auf Grund eines sich verschlechternden Blutbildes, Übelkeit, Schleimhautentzündungen, Hautverbrennungen- und -rötungen und Durchfall auftreten.

Haben sich schon Metastasen in andere Organe des Körpers abgesiedelt, reichen meist die lokalen Behandlungsformen Operation und/oder Bestrahlung allein nicht mehr aus, um die weitere Ausbreitung der Krebserkrankung aufzuhalten. In diesen Fällen muss die systemische Behandlung mit Zytostatika den gesamten Organismus erfassen. Meist werden mehrere Zytostatika kombiniert und gleichzeitig eingesetzt. Dabei gibt es eine große Anzahl verschiedener Chemotherapie-Kombinationen, die in ihrer Wirkung und auch in ihrer Verträglichkeit sehr unterschiedlich sind. Da die intravenös verabreichten Substanzen über den Blutstrom in alle Regionen des Körpers gelangen, spricht man auch von "systemischer Therapie".

Ein Problem der Chemotherapie ist die Resistenzentwicklung. Viele Tumoren können sich unter der Behandlung so sehr verändern, dass sie nicht mehr auf das entsprechende Zytostatikum ansprechen. Darüber hinaus ist die Chemotherapie bei vielen Tumorerkrankungen von vornherein nur wenig wirksam.

1.3.2 TNF-α in der Tumortherapie

Seit 1985 wird rekombinantes TNF- α in der klinischen Onkologie verwendet. Präklinische *in vitro*-Experimente mit Zellkulturen und Studien in Tiermodellen konnten die antitumorale Eigenschaft von TNF- α demonstrieren. Phase I und II der klinischen Erprobung zeigten jedoch sehr schnell, dass die systemische Verabreichung von TNF- α zu erheblichen Nebenwirkungen führt. Dabei zeigte sich die systemische Toxizität von TNF- α vor allem in Form von Hypertonie, Fieber, Schüttelfrost, Anorexie, Schwindel, Kopfschmerzen und Müdigkeit. Die klinische Manifestation der Nebenwirkungen ähnelten damit derer, die während Infektionen und Entzündungen beobachtet werden können. Die maximal tolerierte Dosis bei fortgeschrittenen Krebspatienten lag mit durchschnittlich 300 g/m² sehr niedrig und nur selten sprachen die Tumoren auf die Behandlung an (Zamkoff, Newman et al., 1989). Seit 1988 wird weitgehend auf eine systemischen Verabreichung von TNF- α verzichtet.

1.3.3 Neue Strategien in der Tumortherapie mit TNF-α

Um jedoch nicht völlig auf TNF- α in der Tumortherapie verzichten zu müssen, wurden neue Strategien entwickelt, die toxischen Nebenwirkungen bei der Therapie mit TNF- α zu reduzieren. Dabei spielen die lokale Applikation von TNF- α , eine Kombination mit anderen Zytokinen oder Chemotherapeutika und gezielte Gentherapie eine wesentliche Rolle. Diese neuen Ansätze werden zum Teil schon in klinischen Studien geprüft und könnten in naher Zukunft in der Tumortherapie ihren festen Platz haben.

1.3.3.1 Isolierte Extremitätenperfusion

Um die hohen Nebenwirkungen, die bei der systemischen Verabreichung von TNF- α auftraten, zu umgehen, wird eine direkte Applikation von TNF- α an den Ort des neoplastischen Geschehens angestrebt. Die isolierte Extremitätenperfusion ("isolated limb perfusion") ist eine etablierte Methode für die Behandlung regional fortgeschrittener Melanome und Weichteilsarkome (Fraker und Alexander et al., 1994). Bei dieser Methodik werden die zu- und abführenden Gefäße der Extremität chirurgisch an eine extrakorporale Pumpe angeschlossen, was die Gabe hoher Dosen eines Zytostatikums mit akzeptabler Toxizität und minimalen systemischen Nebenwirkungen erlaubt. Dabei konnte in vielen Fällen eine vollständige und lang andauernde Tumorregression erzielt werden (Lejeune, Lienard et al., 1994). Um die Toxizität der Therapie zusätzlich herabzusetzen, wurden Kombinationstherapien durchgeführt, wobei mit Dreier-Kombination von TNF-α, Melphalan und Interferon- γ bei Hyperthermie große Erfolge erzielt werden konnten (Lejeune, Lienard et al., 1995). Darauf aufbauend wurden weitere Studien durchgeführt wie die isolierte Perfusion von Nieren mit TNF-a bei regionalem Nierenzellkarzinom und die isolierte hepatische Perfusion mit TNF- α und Melphalan beim Schwein. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse, die in weiteren Studien bestätigt wurden (Lejeune, 1997), bleibt der große Nachteil dieser Therapieform die Beschränkung auf die lokale Anwendbarkeit.

1.3.3.2 Retrovirale Gentherapie

Eine noch stärker lokal beschränkte Wirkung von TNF- α kann durch den spezifischen Gentransfer in die Zellen des Tumors oder angrenzenden Gewebes erreicht werden. Von einigen Forschungsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Implantation von Tumorzellen, die zuvor durch *in vitro*-Einschleusung von Zytokingenen modifiziert wurden, zu potenter antitumoraler Aktivität *in vivo* bei Mäusen führen kann. Diese Methoden sind noch in der Entwicklungsphase und bis heute wurden nur Versuche in Zellkulturen und in Tieren durchgeführt. In Studien mit TNF- α -Gen transfizierten Fibroblasten begannen diese Zellen TNF- α zu produzieren und besaßen dadurch antitumorale Eigenschaften (Fushimi, Torigoe et al., 1998). In einer weiteren Studie zeigte die intratumorale Injektion von TNF- α in einem Vektor mit begleitender Bestrahlung völlige Tumorregression in 70 % der implantierten humanen Gliome in athymischen Nacktmäusen (Staba, Mauceri et al., 1998).

Retrovirale Vektoren sind modifizierte Retroviren, in denen Gene, die für die Replikation benötigt werden (*gag*, *pol* und *env*), eliminiert und durch gewünschte Gene ersetzt wurden.

Zur genetischen Information, die in den Vektoren erhalten wird, gehören die langen terminalen Wiederholungen, die sowohl für die Expression des viralen Genoms als auch für die Integration des Proviruses in das Wirtsgenom notwendig sind. Ferner sind die Signale für die reverse Transkription des viralen Genoms und für die Einkapselung (ψ -Motiv) der retroviralen Genome in die Viruspartikel der virusproduzierenden Zellen erhalten. Weil rekombinante Retroviren nicht kompetent für Replikation sind, werden sie von Verpackungszelllinien produziert, die speziell hergestellt wurden, um die eliminierten *gag*, *pol* und *env*-Gene zu exprimieren.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Da schnell wachsende Tumoren zur Aufrechterhaltung ihres gesteigerten Nähr- und Sauerstoffbedarfes auf das Wachstum von neuen Tumorgefäßen angewiesen sind, basiert ein Forschungsansatz zur experimentellen Tumortherapie auf der Möglichkeit, den Tumor durch eine gegen das Gefäßendothel gerichtete Therapie von der notwendigen Blutversorgung abzuschneiden und Tumorregression auszulösen. Die Sensibilisierung des Tumorendothels durch endothelzellaktivierende Faktoren spielt dabei eine entscheidende Rolle. Kürzlich hat unsere Arbeitsgruppe herausgefunden, dass tmTNF- α im Tumorendothel des TNF-sensitiven Meth-A-Sarkoms der Maus hochreguliert ist. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass das tmTNF- α -Protein das Tumorendothel voraktiviert und so für die VEGF induzierte Gefäßhyperpermeabilität absolut notwendig ist (Clauss, Sunderkotter et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde am Meth A- und B16-Tumormodell versucht, unter Verwendung von retroviralem Genstransfer, nicht prozessierbares tmTNF im Tumorendothel zu exprimieren. Damit sollte nicht nur die therapeutisch benötigte Konzentration an toxischem löslichem TNF erniedrigt werden, sondern auch die höhere endothelaktivierende Potenz von tmTNF ausgenutzt werden.

Für den Gentransfer stand ein retroviraler Vektor zur Verfügung, der für eine nicht spaltbare, mutierte Form von murinem tmTNF kodierte. Mit Hilfe eines Gerinnungstests sollte zunächst die biologische Aktivität der Zellklone getestet werden. Anschließend sollte versucht werden, den retroviralen Titer durch Konzentrierung zu steigern, um eine effizientere Infektion der Tumorzellen und Tumorendothelzellen zu erreichen. Schließlich sollten die konzentrierten retroviralen Vektoren *in vivo* am Mausmodell des Meth-A-Sarkoms und des B16-Melanoms therapeutisch angewendet und die Antitumorwirkung der Behandlung anhand induzierter hämorrhagischer Nekrosen und Reduktion des Tumorgewichts dokumentiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Zentrifugen:	Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg)					
	Tischzentrifuge 4-10 (Sigma, Deisenhofen)					
	Kühlzentrifuge Centrikon T-124 (Kontron Instruments, Zürich, CH)					
	Kühlzentrifuge Centrikon T-1170 (Kontron Instruments, Zürich, CH)					
	Rotor A 8.24 (Kontron Instruments, Zürich, CH)					
	Rotor A 6.14 (Kontron Instruments, Zürich, CH)					
Inkubatoren:	CO ₂ -begasbarer Brutschrank für Zellkultur IR-Autoflow (Nuaire über Zapf, Sarstedt)					
Mikroskope:	Axiocam (Zeiss, Oberkochen)					
	Axiophot (Zeiss, Oberkochen)					
	Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen)					
	Standard 25 (Zeiss, Oberkochen)					
	Stemi SV 11 Präparationsmikroskop (Zeiss, Oberkochen)					
	Wilovert S (Hund, Wetzlar)					
Schüttler:	IKA-Schüttler MTS2 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik,					
	Staufen/Breisgau)					
	Kreisschüttler KS 250 basic (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik,					
	Staufen/Breisgau)					
	Rocky (Uniequip Laborgerätebedarf, München)					
	Vortex VF2 (Bender und Hobein AG, Zürich, CH)					
Sonstige:	Autoklav Varioklav Typ 300 (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)					
	Digitalkamera Axiocam (Zeiss, Oberkochen)					
	Digitalkamera Fuji HC-300Z (Fuji Film über Raytest,					
	Straubenhardt)					
	Feinwaage MC1 Research RC210D (Sartorius, Göttingen)					
	Heizblock Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)					
	Heizplatte (Medax Nagel GmbH, Kiel)					
	Kryostat Microm HM 500 OM (Microm Laborgeräte, Walldorf)					

Laborwaage MC1 Laboratory LC4800P (Sartorius, Göttingen) Magnetrührer Ikamag RCT (IKA Labortechnik, Staufen/Breisgau) Netzgerät Modell E455 (Consort über Fröbel, Wasserburg) PH-Meßgerät 192 (WTW, Weilheim) Pipetten (Abimed, Langenfeld; Eppendorf, Hamburg) Sterilbank Class II, Typ A/B3 (Nuaire über Zapf, Sarstedt) Wasserbad Modell SW-20C (Julabo Labortechnik, Seelbach) Zellzählgerät (Casey-1, Schärfe-System, Reutlingen)

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern im Text nicht näher bezeichnet, von den folgenden Firmen im Reinheitsgrad p.A. bezogen:

Boehringer (Mannheim), Difco (Augsburg), Fluka (Neu Ulm), Gibco Life Technologies (Eggenstein), Hoechst AG (Frankfurt/Main), J.T. Baker (Griesheim), Merck/Fischer (Frankfurt), Riedel-de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen).

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1	Standardlösungen	und –medien	für die	Gewebekultur
-------	------------------	-------------	---------	--------------

PBS:	"Phosphate buffered saline" 1 x (Biochrom, Berlin)
DMEM ⁺ :	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium mit 4,5 g/l Glukose (Gibco Life Technologies, Eggenstein)
RPMI:	Medium RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Eggenstein)
FCS:	Fötales Kälberserum (Cytogen, Costar, Bodenheim) (Lot Nr. A01125-213, PAA Laboratories, Cölbe) (ChB. S604920, PAN Systems, Aidenbach)
CS:	Kälberserum (Lot Nr. 104H9325, Sigma, Deisenhofen) (Lot Nr. 55H9301, Sigma, Deisenhofen)
HS:	Humanserum (Sigma, Deisenhofen)
L-Glutamin:	200 mM Glutamin (Gibco Life Technologies, Eggenstein) Endkonzentration 2 mM
MCDB 131:	Medium MCDB 131 (Gibco Life Technologies, Eggenstein)
Natriumpyruvat:	100 mM (Gibco Life Technologies, Eggenstein) Endkonzentration 1mM
ECGS:	3mg/ml Endothelzell-Wachstumszusatz (Promocell, Heidelberg)
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA (PAA Laboratories, Cölbe)
Heparin:	10 mg/ml in PBS (Sigma, Deisenhofen)

P/S:	Penicillin-Streptomycin (PAA Laboratories, Cölbe) 10000 Einheiten/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin Endkonzentration 1 % (v/v)
Gentamycin:	10 mg/ml (Gibco Life Technologies, Eggenstein) Endkonzentration 1 mg/ml
Gelatine:	0,2 % (w/v) in PBS (Serva, Heidelberg)

2.3.2 Verwendete Zelllinien und Kulturmedien

Bezeichnung	Referenz	Beschreibung	Medium/Substrat			
HUVEC	Jaffe et al., 1973; Thornton et al., 1983	Humane Nabelschnurvenen- endothelzellen	MCDB131 / 8% FCS / 2% HS / 100 μg/ml Heparin / 1% P/S / 1% Amph / 1% Gln / 0,4% ECGS/Gelatine			
NIH 3T3	Millauer et al., 1994	Murine Fibroblasten	DMEM ⁺ / 10 % FCS			
GP+E86	Markowitz et al., 1988	Verpackungszelllinie zur helfervirusfreien Produktion ekotroper Retroviren	DMEM ⁺ / 10 % FCS			
GP+E86-pBabeNeo	Dr. Georg Breier (MPI, Bad Nauheim)	pBabeNeo- exprimierende GP+E86-Zelllinie	DMEM ⁺ / 10 % FCS			
GP+E86-pBabeNeo- tm TNF #3	Andreas Hilbig (MPI, Bad Nauheim)	pBabeNeo-tmTNF- exprimierende GP+E86-Zelllinie	DMEM ⁺ / 10 % FCS			
GP+E86-pBabeNeo- tmTNF #15	Andreas Hilbig (MPI, Bad Nauheim)	pBabeNeo-tmTNF- exprimierende GP+E86-Zelllinie	DMEM ⁺ / 10 % FCS			
BFS-1	Dr. Daniela Maennel (Regensburg)	Murine Sarkomzellen	RPMI 1640 / 10 %FCS / 2 % Gln / 1 % P/S / 1 % Na-Pyruvat			
B16	Dr. Daniela Maennel (Regensburg)	Murine Melanomzellen	DMEM ⁺ / 10 % FCS / 2 % Gln / 1 % P/S / 1 % Na-Pyruvat			

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Zelllinien und Kulturmedien.

2.3.3 Kultivieren von eukaryontischen Zellen

Die Kultivierung eukaryontischer Zellen erfolgte im entsprechenden Wachstumsmedium (Tab. 2.1) auf Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturschalen (Costar, Bodenheim; Greiner, Solingen; Nunc, Wiesbaden-Biebrich) in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Zelllinien wurden in 75 cm² großen Gewebekulturschalen kultiviert. Nach erreichter Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert, bis sie sich abzulösen begannen. Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und nach Zugabe von 5 ml Wachstumsmedium durch die darin enthaltenen Trypsininhibitoren gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner, Solingen) überführt und für 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde vorsichtig in frischem Medium resuspendiert und in neuen Gewebekulturschalen ausgesät.

2.3.4 Langzeitlagerung von eukaryontischen Zellen

Die Langzeitlagerung von eukaryontischen Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die Zellen wie im vorigen Kapitel beschrieben von der Gewebekulturschale abgelöst und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml Wachstumsmedium mit 10 % DMSO (Sigma, Deisenhofen) resuspendiert, je 2 ml in Kryoröhrchen (Greiner, Solingen) überführt und über Nacht in aufrechter Position bei -80 °C eingefroren. Etwa 3 – 4 Tage später wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C möglichst schnell aufgetaut und das Kryoröhrchen von außen mit 70% igem Ethanol gereinigt. Dann wurde die Zellsuspension in 5 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium aufgenommen und für 5 min bei 1200 UpM zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert und in Gewebekulturflaschen ausgesät. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben.

2.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden wie oben beschrieben von der Kulturschale abgelöst und in einem definierten Volumen Wachstumsmedium resuspendiert. Eine geringe Menge der Zellsuspension wurde entnommen, die Zellen mit einem Neubauer-Hämazytometer ausgezählt und die Zellzahl dann auf das Gesamtvolumen bezogen bestimmt.

2.4 Isolation und Konzentration retroviraler Vektoren

Zur Konzentrierung der Retroviren wurden zwei Protokolle miteinander verglichen, um in den weiteren Versuchen stets die effektivere Methode anzuwenden.

2.4.1 Isolation und Konzentrierung von Retroviren nach Constance Cepko

Die GP+E86-Zellklone wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen im entsprechenden Medium bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Die Zellen wurden dann aus der Flasche herausgelöst, 1:4 verdünnt in frischem Medium resuspendiert und in neue Flaschen verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde das Medium abgenommen, durch einen 0,45 μ m Filter gefiltert und in sterile (mit 100%igem Ethanol gewaschene) Zentrifugenbehälter (Beckman Centrifuge, Bremen) gegeben. Dann wurde das Medium bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von 20000 UpM für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in sterile Zentrifugenbehälter gegeben und unter gleichen Bedingungen wie zuvor, nun aber für 2 h, zentrifugiert. Nach dieser zweiten Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Pellet mit einer Pasteur-Pipette in PBS + 1 % BSA, in 5 % des ursprünglichen Mediumvolumens resuspendiert. Das Viruskonzentrat wurde bis zur Verwendung in 2 ml Cryo-Vials bei –80 °C gelagert.

2.4.2 Isolation und Konzentrierung von Retroviren nach Neil E. Bowles

Die GP+E86-Zellklone wurden wie in 2.4.1 beschrieben kultiviert, in neue Flaschen verteilt, für 72 h inkubiert und das Medium durch 0,45 μ m Filter gefiltert. Das Medium wurde dann in sterile, mit Ethanol absolut gewaschen, 280 ml Zentrifugenbehälter gegeben. Jeweils insgesamt 6 Behälter wurden in den Rotor (A 6.14, Kontron Instruments, Zürich, Schweiz) gegeben und für 16 h bei 4 °C bei 6000 UpM zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand durch Aspiration entfernt und das Pellet mit einer Pasteur-Pipette in PBS + 1 % Albumin, in 1 % des ursprünglichen Mediumvolumens resuspendiert. Das Viruskonzentrat wurde durch 0,45 μ m Filter gefiltert und bis zur Verwendung in 2 ml Cryo-Vials bei –80 °C gelagert.

2.4.3 Bestimmung des Virustiters

Am Tag vor der Titerbestimmung wurden NIH 3T3-Zellen in einer Dichte von 1 x 10^5 Zellen pro 28 cm² Schale (Greiner, Solingen) ausgesät. Das Viruskonzentrat wurde aufgetaut und in Verdünnungen von 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} zur Infektion auf NIH 3T3-Zellen gegeben. Nach 3 h

Inkubation im Brutschrank (37 °C) wurden 3 ml 3T3-Medium hinzugefügt. Nach weiteren 48 h Inkubation wurde jede 28 cm² Schale 1:18 auf jeweils zwei 78 cm² Schalen (Greiner, Solingen) gesplittet. Zum 3T3-Medium wurde zur Selektion der infizierten Zellen das Antibiotikum G418 in einer Verdünnung von 1:100 hinzugefügt. Die durch das G418-Antibiotikum selektionierten Zellklone wurden nach 10 - 14 Tagen mit Kristallviolett-Lösung (0,5 % (w/v) in 30 % Methanol) gefärbt und ausgezählt. Der Virustiter berechnet sich aus der Anzahl der Kolonien multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor unter Berücksichtigung des zur Infektion eingesetzten Volumens und wird in "Kolonie-bildende Einheiten" (cfu) pro ml Kulturüberstand angegeben.

2.5 Histologie

2.5.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Das in Tissue Tek (Sakura, Tokyo, Japan) eingebettete Gewebe wurde aus dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen und für mindestens 15 min auf -20 °C erwärmt. Im Kryostat wurden bei einer Kammertemperatur von -22 °C und einer Messertemperatur von -17 °C 8 μ m-Schnitte des Gewebes angefertigt und auf TESPA-beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) transferiert. Die Gewebeschnitte wurden für mindestens 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und entweder sofort für eine Färbung verwendet oder bei -20 °C in mit Kieselgelsäckchen (Merck/Fischer, Frankfurt) bestückten Einfrierboxen (Kartell, Noviglio, Italien) gelagert.

2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung basiert auf der Oxidation von Hämatoxylin zu dem blauen Farbstoff Hämatein. Dieser bildet mit Aluminiumionen positiv geladenen Komplexe, die ihrerseits mit basophilen Strukturen interagieren, etwa den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS im Zellkern. Azidophile Zell- und Gewebestrukturen wie das Zytoplasma oder Interzellularsubstanzen werden rot gefärbt.

Die eingefrorenen Gewebeschnitte wurden für mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend für 1 min in PBS rehydriert und 2 min in Hämatoxylin-Lösung Gill Nr.1 (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. In einem 10minütigen Waschschritt unter fließendem Leitungswasser wurde überflüssiger Farbstoff entfernt. Die Gewebeschnitte wurden in einem zweiten Färbungsschritt für 1 min mit Eosin-Y-Lösung (Sigma, Deisenhofen) angefärbt und anschließend für 10 bis 30 sec in 70 % Ethanol-Lösung differenziert. Dann wurden die

Schnitte für jeweils 5 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (90 %, 96 % und 100 %) entwässert, 2 x 8 min in Roticlear (Roth, Karlsruhe) inkubiert und in Entellan (Merck/Fischer, Frankfurt) eingedeckelt.

2.6 Immunproteinchemie

2.6.1 Standardlösungen für die Proteinbiochemie und die Immunhistologie

PBS: 0,137 M NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂HPO₄ 1,4 mM KH₂PO₄

TBS: 20 mM Tris-HCl (ph 7,6) 50 mM NaCl

TBSA: 1 % (w/v) BSA in TBS

TBST: 1 % (v/v) Tween 20 in TBS

2.6.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Die eingefrorenen Gewebeschnitte wurden für mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut, dann 10 min mit –20 °C kaltem Aceton fixiert und 30 min luftgetrocknet. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Fettstift (DAKO, Hamburg) umrandet, 5 min in TBS rehydriert und anschließend mit je 100 μ l Blocklösung (Tab. 2.2) für 60 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer auf einem Schüttler inkubiert. Nach einem kurzen Waschschritt in TBS folgte die 1. Inkubation über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte 1 x mit TBS und 2 x mit TBST je 5 min auf dem Schüttler mit 200 μ l/Schnitt gewaschen. Der 2. und 3. Inkubationsschritt fand jeweils für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer auf einem Schüttler statt. Zwischendurch wurden die Schnitte 3 x für 5 min in TBS und 1 x in destilliertem Wasser gewaschen und mit Mowiol eingedeckt. Die Präparate wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend im Dunkeln gelagert.

Mowiol wurde als Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen verwendet, da es lichtempfindliche Fluoreszenzfarbstoffe konserviert. Dies ermöglicht das Analysieren von Präparaten über einen Zeitraum von mehreren Monaten.

Zur Herstellung von Mowiol wurden 6 g Glycerol (87 %) mit 2,4 g Mowiol (Calbiochem, Bad Soden) in einem 50 ml Falconröhrchen verrührt und nach Zugabe von 6 ml H₂O für 2 h auf einem Drehschüttler gemischt. Nach Zugabe von 12 ml 200 mM Tris-HCl (pH 8,5) wurde die Lösung für 30 min auf 60 °C erwärmt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur für 20 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und in Eppendorf-Gefäßen bei -20 °C gelagert. Die jeweilige Gebrauchslösung wurde bei 4 °C gelagert und vor Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Analyse der Präparate erfolgte mikroskopisch (Axiophot oder Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen) durch Anregung der Farbstoffe mittels UV-Licht geeigneter Wellenlänge.

Blocklösung	Inkubation I	Inkubation II	Inkubation III		
30min, RT	über Nacht, 4°C	30min, RT	30min, RT		
50 % Ziegenserum + 10	mAK rat-anti-	goat-anti-rat IgG-	FITC-Streptavidin,		
% Kaninchenserum in	muPECAM-1, Überst.	Biotin, 1:250 in TBSA	1:1000 in TBSA		
TBSA	(Mec 13.3)				
TBSA	sTNFRI/Fc,	rab-anti-hu IgG,	goat-anti-rab IgG-Cy3,		
	1µg/ml in TBSA	1:250 in TBSA	1:250 in TBSA		
TBSA	mAK rat-anti-	goat-anti-rat IgG-	FITC-Streptavidin,		
	muPECAM-1, Überst.	Biotin, 1:100 in TBSA	1:1000 in TBSA +		
+ sTNFRI/Fc, 1µg/ml		+ rab-anti-hu IgG,	goat-anti-rab IgG-Cy3,		
in TBSA		1:100 in TBSA	1:250 in TBSA		

Tab. 2.2: Übersicht über die Verwendung von Blocklösung, Erst- und Zweitantikörperpaaren für die indirekte Immunfluoreszenz

Abkürzungen: (Cy3) Indocarbocyanin, (FITC) Fluoresceinisothiocyanat, (goat) Ziege, (hu) human, (mAK) monoklonaler Antikörper, (mu) Maus, (rab) Kaninchen, (rat) Ratte, (RT) Raumtemperatur, (sTNFRI/Fc) lösliche TNFRI/Fc-Chimäre, (Übst.) Hybridomüberstand.

2.7 Morphologische Auswertung von Gewebeschnitten

2.7.1 Bestimmung der Kapillardichte in Gewebeschnitten

Um die Tumorkapillaren für eine Auszählung sichtbar zu machen, wurde zunächst wie in 2.6.2 beschrieben eine Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Endothelzellmarker PECAM-1 (Mec 13.3) durchgeführt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Axiophot, Zeiss, Oberkochen) wurden die Tumorgefäße eines repräsentanten Tumorabschnittes dargestellt und mit einer digitalen Kamera (AxioCam, Zeiss, Oberkochen) fotografiert. Nachdem die Abbildungen ausgedruckt wurden, wurde die Anzahl der Kapillaranschnitte ausgezählt und durch die gesamte Gewebeschnittfläche geteilt.

2.7.2 Bestimmung des Gefäßanteils in Gewebeschnitten

Wie in 2.7.1 beschrieben wurden die Gewebeschnitte angefärbt, fotografiert und auf Papier ausgedruckt. Die Bestimmung der Kapillardichte erfolgte mit Hilfe eines durchsichtigen Rasters bestehend aus 1 cm² großen Quadraten. Durch Auflegen des Rasters auf die Papierausdrucke und Auszählung der Quadrate, die Kapillaren schnitten, konnte das Verhältnis zwischen der summierten Kapillarflächen und des Tumorgewebeschnittes berechnet werden.

2.7.3 Bestimmung des Nekroseanteils in Gewebeschnitten

Die Gewebeschnitten wurden wie in 2.5.2 beschrieben durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt und mit einer im Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen) integrierten Digitalkamera (Fuji HC-300Z, Fuji Film über Raytest, Straubenhardt) fotografiert. Anschließend wurden die Abbildungen ausgedruckt. Die Bestimmung des Anteiles der Nekroseareale erfolgte mit Hilfe des in 2.7.2 beschrieben Rasters. Durch Auszählung der Quadrate, die intaktes bzw. nekrotisches Tumorgewebe schnitten, konnte der Nekroseanteil des Tumorgewebeschnittes berechnet werden.

2.8 In vitro Studien zur biologischen Aktivität

2.8.1 Gerinnungstest

Im Gerinnungstest wurde die Aktivität von Gewebsthromboplastin in HUVEC nachgewiesen. Gewebsthromboplastin ist als Oberflächenmolekül auf Endothelzellen exprimiert und ist der Initiator der extrinsischen Gerinnungskaskade.

Humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) der Passagen 2 bis 4 wurden auf gelatinisierte Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm ausgesät und bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 1 x 10⁵ GP+E86-Zellen (transfiziert/untransfiziert) in 3 ml Wachstumsmedium für 6–8 h bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Zugabe von je 5 pM rekombinantem humanem TNF (Boehringer, Mannheim), als Negativkontrolle wurden die HUVEC ausschließlich mit Wachstumsmedium inkubiert. Es wurden jeweils drei Proben analysiert, von denen der Mittelwert ermittelt wurde.

Zur Quantifizierung der Gerinnungsaktivität wurden die HUVEC einmal mit Gerinnungspuffer (4 °C) gewaschen und pro 35 mm-Schale mit 1 ml Gerinnungspuffer versetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner, Frickenhausen) vom Boden der Kulturschale abgelöst, in Glasröhrchen (Neutrex) überführt und für 5 min bei 3000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 100 μ l Gerinnungspuffer resuspendiert. Die Proben wurden entweder sofort analysiert oder bis zum Zeitpunkt der Auswertung bei -80 °C gelagert.

Zur Durchführung des Gerinnungstests wurden die Proben mit 100 µl humanem Plasma gemischt, mit 100 µl CaCl₂-Lösung (20 mM CaCl₂ in ddH₂O) versetzt und in einem Wasserbad bei 37 °C bis zum Auftreten eines visuell wahrnehmbaren Fibringerinnsels geschüttelt. Die Zeit zwischen Zugabe der CaCl₂-Lösung und des Auftretens des Fibrinklumpens wurde gemessen und über die Formel 3,21 x 10¹¹ x X^{-5,4524} (X = gemessene Zeit in sec) in pg Gewebsthromboplastin-Äquivalent pro Probe umgerechnet. Hierbei entspricht 1 Gewebsthromboplastin-Äquivalent der gerinnungsfördernden Aktivität von 1 pg rekombinantem Gewebsthromboplastin-Protein.

2.9 Experimente am Tiermodell

2.9.1 Subkutane Implantation von Tumorzellen und intratumorale bzw. intraperitoneale Injektion von Lösungen

Die Meth-A-Sarkomzellen bzw. B16-Melanomzellen wurden mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Kulturschale abgelöst (vgl. 2.3.3), durch Zentrifugation (5 min bei 1200 UpM) pelletiert und in sterilem PBS resuspendiert (3 x 10^7 Zellen/ml). Die Mäuse (C57/Bl6) wurden kurz mit Halothan narkotisiert (Fluothane, Zeneca GmbH, Plankstadt) und das Fell an der Injektionsstelle durch Rasur entfernt. Pro Maus wurden 1,5 x 10^6 Tumorzellen in einem Volumen von 50 µl PBS subkutan in den Rücken injiziert. Nach Anwachsen der Zellen wurde das Tumorvolumen regelmäßig kontrolliert. Am Tag 7 bis 10 nach der Inokulation, wenn der Tumor ein Volumen von etwa 1 cm³ besaß, wurden entweder Viruskonzentrat, lösliches rekombinantes humanes TNF (Boehringer, Mannheim) oder Melphalan (Alkeran, Glaxo Wellcome, Bad Oldesloe) intratumoral bzw. intraperitoneal verabreicht. In den Tumorexperimenten wurde den Mäusen stets 50 µl Viruskonzentrat injiziert. Dies entspricht beim transfizierten GP+E86-tmTNF-Zellklon etwa 5 x 10^6 infektiösen Partikeln und beim Leervektor 2 x 10^6 infektiösen Partikeln. Kleine Variationen ließen sich durch die Prozedur der Konzentrierung und der Injektion nicht verhindern.

Als Kontrolle wurde den Mäusen 50 µl PBS injiziert.

2.9.2 Isolierung von Tumorgewebe

Nach einer definierten Zeitspanne nach der therapeutischen Behandlung wurden die Mäuse narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Die über dem Tumorgewebe lokalisierte Haut wurde geöffnet, der zwischen Haut und Muskel gelegene Tumor herausgeschält und in PBS (4 °C) überführt. Anschließend wurde das Tumorgewebe in Tissue Tek eingebettet und sofort mit Trockeneis/Isopentan eingefroren. Die Lagerung des eingebetteten Tumorgewebes erfolgte bei –80 °C.

3 Ergebnisse

3.1 In vitro-Analyse der GPE+E86-Zellklone

3.1.1 Analyse der durch transfizierte GP+E86-Zellen induzierte Expression von Tissue Factor

Für den Gentransfer wurde ein retroviraler Vektor verwendet, der für eine nicht spaltbare, mutierte Form von murinem tmTNF kodiert. Um zu verhindern, dass die membranständige Form von TNF durch die entsprechende Metalloproteinase (TACE) in die lösliche Form gespalten wird, wurde artifiziell eine Mutation an der Schnittstelle zwischen der Vorläufersequenz und der reifen löslichen Form von TNF induziert. Dazu wurden an der Schnittstelle 9 Aminosäuren entfernt und an Position 11 die Aminosäure Lysin durch Glutamat ersetzt. Nachdem die cDNS des murinen tmTNF in den retroviralen Vektor pBabe Neo (Morgenstern und Land, 1990) kloniert wurde, wurden die virusverpackende GP+E86-Zellen mit diesem Vektor transfiziert (Markowitz, Goff et al., 1988; Dissertation von Andreas Hilbig, 2002). Insgesamt wurden 17 transfizierte GP+E86-Zellkolonien isoliert und expandiert. Da aber nur bei den Zellklonen #3 und #15 mittels RT-PCR die spezifische tmTNF-Sequenz auf RNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (Dissertation von Andreas Hilbig, 2002), wurden die folgenden Experimente nur mit diesen beiden Zellklonen (GP+E86-tmTNF #3 bzw. GP+E86-tmTNF #15) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente stets ein GP+E86-Zellklon, der lediglich mit dem retroviralen Vektor pBabe Neo transfiziert wurde (GP+E86-pBabeNeo). Die von diesem Zellklon sezernierten retroviralen Vektoren (Re.pBabeNeo) kodierten somit nicht für tmTNF.

Da nach Infektion von virusproduzierenden Zellen neben der Hüllproteine auch andere retrovirale Polypeptide auf der Zellmembran präsentiert werden, kann ein Gerinnungstest durchgeführt werden, um auf der Oberfläche der GP+E86-tmTNF-Zellen exprimiertes tmTNF zu detektieren (vgl. 2.8.1). Der Gerinnungstest beruht auf der Induktion von Gewebsthromboplastin durch die Stimulation von TNF-Rezeptoren (Clauss, Gerlach et al., 1990). Die TNF-induzierte Expression des Membranproteins Gewebsthromboplastin auf den verwendeten Zellen (HUVEC) führt nach Zugabe von humanem Plasma und Rekalzifizierung mit CaCl₂-Lösung zu einer verkürzten Gerinnungszeit im Vergleich zu unstimulierten HUVEC. Als Positivkontrolle dienten HUVEC, die mit 5 pM rekombinantem humanem TNF inkubiert wurden, als Negativkontrolle wurden die HUVEC ausschließlich mit Medium versetzt. Um sicherzustellen, dass die mit tmTNF transfizierten GP+E86-Zellen stets biologisch aktiv waren, wurde der Gerinnungstest in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

An dieser Stelle wird ein repräsentatives Beispiel für einen durchgeführten Gerinnungstest gezeigt (Abb. 3.1). Der GP+E86-tmTNF-Zellklon #15 p+24 zeigte mit dem Mittelwert von ca. 3000 pg Gewebsthromboplastin-Äquivalent/Test die stärkste Induktion von Gewebsthromboplastin und somit indirekt die höchste Expressionsrate von TNF. Im Vergleich zu den Leervektor-GP+E86-Zellen lag der Wert um den Faktor 80 höher. Ebenso zeigte der GP+E86-tmTNF-Zellklon #3 p+17, mit einem Wert von etwa 1800 pg Gewebsthromboplastin-Äquivalent/Test, die Fähigkeit der Stimulation der Gewebsthromboplastin-Aktivität in HUVEC, die im Vergleich zu den GP+E86-pBabeNeo-Zellen 50mal höher lag. Der Mittelwert der mit löslichem TNF stimulierten HUVEC (Positivkontrolle) lag mit 3500 pg Gewebsthromboplastin-Äquivalent/Test wie erwartet höher als die Werte der Klone #3 und #15. Mit 40 ng Gewebsthromboplastin-Äquivalente/Test lag der Mittelwert der unstimulierten HUVEC (Negativkontrolle) im Bereich des Wertes der GP+E86-pBabeNeoZellen.



Abb. 3.1: Effekt der GP+E86-Zellklone auf TNF- α -vermittelte Gewebsthromboplastin-Induktion. HUVEC wurden 6 – 8 h bei 37 °C mit den GP+E86-Zellklonen verschiedener Passagen stimuliert. Als Kontrollen wurden lösliches TNF und Medium alleine eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SA der ermittelten Ergebnisse bei drei analysierten Proben.

In weiteren Gerinnungstests konnten die ermittelten Werte für die beiden transfizierten GP+E86-Zellklone #3 und #15 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse von vier unabhängigen Experimenten ergab eine durchschnittliche Erhöhung der Stimulation der

Gewebsthromboplastin-Aktivität der HUVEC um den Faktor 70 durch die GP+E86-tmTNF-Zellen #15 und um den Faktor 50 durch den GP+E86-tmTNF-Zellen #3 im Vergleich zu den GP+E86-pBabeNeo-Zellen. Die Variation der Werte in den einzelnen Experimenten kann auf die Unterschiede in der Herkunft der HUVEC (Spender) und des Plasmas, sowie auf Abweichungen der individuellen Messgenauigkeit zurückgeführt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die gerinnungsfördernde Aktivität der GP+E86tmTNF-Zellen gegenüber den GP+E86-pBabeNeo-Zellen signifikant und konstant erhöht blieb. Deren durchschnittliche Stimulation der Gewebsthromboplastin-Äquivalent-Aktivität lag stets im Bereich der unstimulierten HUVEC.

3.1.2 Bestimmung des retroviralen Titers

Um die von den virusverpackenden Zelllinien freigesetzte Anzahl von Retroviren zu bestimmen, wurden Titerbestimmungen durchgeführt (vgl. 2.4.4). Zusätzlich wurde eine Kinetik erstellt, mit deren Hilfe herausgefunden werden sollte, nach welchem Zeitraum nach Zugabe frischen Zellmediums zu den GPE-E86-Zellen, sich die größte Anzahl retroviraler Vektoren im Überstand befindet. Hierzu wurden von den GP+E86-Zellklonen jeweils 24, 48, 72, 96 und 120 h nach Wechsel des Zellmediums ein kleiner Teil des Überstandes entnommen (Abb. 3.2).

Die Auswertung ergab, dass der höchste retrovirale Titer bei dem GP+E86-tmTNF-Zellklon nach 96 h erreicht wurde, bei dem GP+E86-pBabeNeo-Zellklon stellte sich der maximale Virustiter bereits nach 72 h ein. Mit 8,25 x 10⁶ cfu/ml lag die maximale Virusmenge im Überstand des GP+E86-pBabeNeo-Zellklons etwa 4 mal höher als der des GP+E86-tmTNF-Zellklons. Eine Erklärung hierfür könnte die zytotoxische Aktivität des von den GP+E86-tmTNF-Zellklonen exprimierten tmTNF sein (Carswell, Old et al., 1975).



Abb. 3.2: Zeitliche Kinetik des retroviralen Titers im Überstand von virusproduzierenden GP+E86-Zellen. Nach Zugabe frischen Mediums zu halbkonfluenten virusproduzierenden GP+E86-Zellen wurde in regelmäßigen Abständen der sich im Zellüberstand befindende retrovirale Titer gemessen.

Um einen höchstmöglichen Virustiter zu gewährleisten, wurden für die nachfolgenden *in vivo*-Experimente der GP+E86-Überstand zur Gewinnung der retroviralen Vektoren stets 96 h nach Passage der GP+86-Zellen entnommen.

3.2 Isolation und Konzentrierung von Retroviren

Obwohl rekombinante retrovirale Vektoren für die Transfektion von Zielorganen *in vivo* weitläufig genutzt werden, sind die verwendeten viralen Titer oftmals nicht ausreichend, um eine therapeutisch wirksame Infektion der Zielzelle zu erzielen (Bowles, Eisensmith et al., 1996). Deshalb wurde im folgenden Experiment versucht, durch eine Erhöhung des retroviralen Titers eine effektivere Infektion der Zellen zu bewirken. Hierzu wurden zwei verschiedene Protokolle miteinander verglichen, um für anschließende *in vivo*-Versuche die wirksamere Methode anzuwenden (Abb. 3.3).

Bei der Methode nach Constance Cepco (vgl. 2.4.1) wurden retrovirale Titer gemessen, die beim GP+E86-tmTNF-Zellklon im Durchschnitt bei 1,0 x 10^8 cfu/ml und beim GP+E86-pBabeNeo-Zellklon im Durchschnitt bei 2,0 x 10^8 cfu/ml lagen. Bei einem Grundtiter vor Aufkonzentrierung von 1,7 x 10^6 cfu/ml im Durchschnitt beim GP+E86-tmTNF-Zellklon und 5,7 x 10^6 cfu/ml beim GP+E86-pBabeNeo-Zellklon bedeutete dies ein Anstieg des

retroviralen Titers um das 60- bzw. 35fache. Die Konzentrierung der Viren nach der Methode von Neil E. Bowles (vgl. 2.4.2) ergab Werte, die beim GP+E86-tmTNF-Zellklon im Durchschnitt bei $1,3 \ge 10^8$ cfu/ml und beim GP+E86-pBabeNeo-Zellklon bei $4,6 \ge 10^8$ cfu/ml lagen. Gegenüber den Werten vor der Konzentrierung (s.o.) bedeutete dies eine Zunahme der retroviralen Konzentration bei beiden Klonen um etwa das 80fache.



Abb. 3.3: Retrovirale Titer vor und nach Konzentrierung.

Der retrovirale Titer im Überstand der virusproduzierenden GP+E86-Zellen wurde mit Hilfe von zwei Protokollen (Cepco und Bowles) konzentriert, um einen höheren Virustiter zu erzielen.

Da mit Hilfe der Viruskonzentrierung nach Bowles Titer erzielt wurden, die verglichen mit der Virusaufkonzentrierung nach Cepco um den Faktor 1,3 - 2,3 höher lagen, wurden nachfolgende Viruskonzentrierungen stets nach diesem Protokoll durchgeführt.

3.3 In vivo-Tumorexperimente

3.3.1 Tumorkinetik beim Meth-A-Sarkom

Der überwiegende Teil der Versuche, in denen tumortragenden Mäusen entweder lösliches TNF (sTNF) oder für transmembranes TNF kodierende Retroviren (Re.tmTNF) injiziert wurde, erfolgten am Tumormodell des Meth-A-Sarkoms. Zur Analyse der geernteten Tumoren wurden stets Gewebeschnitte hergestellt, die histologisch auf Nekrosen, Grad der Vaskularisierung und TNF-Expression untersucht wurden. Die Tatsache, dass TNF auch endogen in den Endothelzellen unbehandelter Meth-A-Sarkome exprimiert wird (vgl. 1.2) erschwert die immunhistologische Auswertung der mit Re.tmTNF behandelten Tumoren, da nicht eindeutig abgegrenzt werden kann, ob immunhistologisch detektiertes TNF eine Folge erfolgreicher Integration des viralen Genoms oder endogen ist.

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob im Meth-A-Sarkom ein bestimmtes Wachstumsalter existiert, in dem keine endogene TNF-Expression nachgewiesen werden kann. Ziel wäre es dann, Re.tmTNF zu einem Zeitpunkt im Tumorwachstum zu injizieren, in dem das Meth-A-Sarkom kein endogenes TNF exprimiert. Auf diese Weise könnte immunhistologisch nachgewiesene TNF-Expression einer erfolgreichen Integration des retroviralen Genoms zugeschrieben werden.

Hierzu wurden Tumoren, die Mäusen intrakutan auf die Flanken injiziert wurden (vgl. 2.9.1), 5, 7, 9 bzw. 11 Tage nach Inokulation der Meth-A-Sarkomzellen geerntet (vgl. 2.9.2). Nach Wiegen der Tumoren, wurden Gefrierschnitte angefertigt, die immunhistologisch mit Hilfe von anti-PECAM-1- und anti-TNF-Antikörpern (vgl. 2.6.1) sowie mit Hämatoxylin/Eosin (vgl. 2.5.2) gefärbt und auf TNF-Expression, Grad der Nekrotisierung und Gefäßdichte untersucht wurden.

Die immunhistologische Färbung zeigte TNF-Expression in Tumoren jeder Altersgruppe (Tab. 3.1). Bei den Tumoren, die 9 Tage nach Tumorinokulation geerntet wurden, konnte sogar ausnahmslos in jedem Tumor endogene TNF-Expression nachgewiesen werden. Alle Tumoren waren frei von Nekrosen.

Zeitpunkt	Anzahl der	Mikrogefäße	Gefäß-		TNF-Expression						
der Ernte	Tumoren	(pro mm ²)	anschnittsfläche								
			(in %)								
Tag 5	7	220 ± 46	7,9 ± 2,0	++	++	+	+	+	-	-	
Tag 7	7	334 ± 60	5,0 ± 1,3	++	+	+	+	-	-	-	
Tag 9	8	264 ± 56	$4,4 \pm 1,1$	++	+	+	+	+	+	+	+
Tag 11	8	295 ± 78	4,4 ± 1,3	+	+	+	+	+	-	-	-

Tab. 3.1: Histologischer Befund 5, 7, 9, und 11 Tage nach Inokulation von Meth-A-Sarkomzellen in C57/Bl6-Mäuse. An verschiedenen Tagen nach Inokulation von Meth A Tumorzellen wurden die Morphometrie des Gefäßsystems und die TNF-Expression der Tumoren ausgewertet. Die TNF-Expression wurde semiquantitativ bewertet: - keine TNF-Expression nachweisbar, + mäßige TNF-Expression nachweisbar, ++ starke TNF-Expression nachweisbar.

Bei der Auswertung der immunhistologisch mit einem gegen PECAM-1 gerichteten Antikörper gefärbten Tumorschnitte war zu erkennen, dass die Anzahl der Blutgefäße (Gefäßdichte) im Tumor im Laufe des Tumorwachstums deutlich zunimmt (Abb. 3.4). Bei 5 Tage alten Tumoren konnten im Durchschnitt 220 Gefäßanschnitte pro mm² eines repräsentativen Tumorabschnitts gezählt werden. Die Anzahl stieg bis zum 11. Tag kontinuierlich auf 295 Gefäßanschnitte pro mm² an.



Abb. 3.4: Gefäßdichte in Meth-A-Sarkomen in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer. An verschiedenen Tagen nach Tumorzellinokulation wurde die Anzahl von Gefäßanschnitten pro mm² in Tumorbereichen höchster Gefäßdichte ausgezählt.

Während die Anzahl der Gefäße im Laufe des Tumorwachstums deutlich zunahm, nahmen die Durchmesser der Tumorgefäße signifikant ab (s. Abb. 3.6 B, D, F, H). Am 5. Tag nach
Inokulation der Tumorzellen nahmen die Tumorgefäßanschnitte in Bereichen höchster Gefäßdichte im Durchschnitt 7,9 % der Tumorschnittfläche ein. Der Anteil der Gefäßanschnitte am Tumorquerschnitt nahm in den folgenden 6 Tagen beständig bis auf 4,4 % ab (s. Abb. 3.5).



Abb. 3.5: Anteil der Gefäßanschnitte in % in Meth-A-Sarkomen in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer. An verschiedenen Tagen nach Tumorzellinokulation wurde der prozentuale Anteil der Gefäßanschnitte am gesamten untersuchten Tumorgewebe in Tumorbereichen höchster Gefäßdichte ermittelt.

In diesem Experiment konnte kein Zeitpunkt ermittelt werden, in dem alle Tumoren frei von endogener TNF-Expression waren. Deshalb blieb in den folgenenden Versuchen das Problem bestehen, dass bei im Tumor nachgewiesenem TNF nicht bestimmt werden konnte, ob es endogen exprimiert wurde oder die erfolgreiche Integration des Virus-Genoms mit einer konsekutiven Expression von TNF anzeigte. In einigen Versuchen zeigte sich dennoch, dass in einigen Behandlungsgruppen intratumoral deutlich mehr TNF nachgewiesen werden konnte als in anderen.

Die Abnahme des Anteils der Fläche der Gefäßanschnitte am Tumor bei gleichzeitiger Zunahme der Anzahl der Gefäßanschnitte ist Ausdruck für das "Sprouting" der Gefäße im Rahmen der Angiogenese. Hierbei wird zunächst ein primitiver, wenig differenzierter Gefäßplexus gebildet, der anschließend durch Teilung der Endothelzellen in ein archisch gegliedertes, reifes Gefäßsystem umgebaut wird. In den folgenden Experimenten wurde stets auch die Gefäßmorphologie der Tumoren ermittelt. Dabei konnte untersucht werden, ob die entsprechende Behandlung des Tumors zu einer Veränderung des Tumorgefäßsystems oder zu einer Verzögerung in deren Entwicklung führte.



Abb. 3.6.: Immunhistologische Darstellung der TNF-Expression und der Tumorgefäßdichte in Meth-A-Sarkomen, die an verschiedenen Tagen nach Tumorzellinokulation geerntet wurden.

Indirekte Immunfluoreszenz (TNFRI/Fc bzw. Mec 13.3) auf Gefrierschnitten. A,B: Tumorernte an Tag 5. C, D: Tumorernte an Tag 7. E, F: Tumorernte an Tag 9. G, H: Tumorernte an Tag 11.

3.3.2 Intratumorale Injektion von tmTNF-exprimierenden Retroviren in Meth-A-Sarkome

Nach intratumoraler Injektion des für tmTNF-kodierenden retroviralen Vektors Re.tmTNF sollte geprüft werden, ob die Integration des Virusgenoms in Tumor- bzw. Tumorendothelzellen im Tumor eine erhöhte tmTNF-Expression bzw. eine vermehrte Ausbildung von Nekrosen verursacht.

Dazu wurde Mäusen 10 Tage nach intrakutaner Inokulation von Meth-A-Sarkomzellen auf den Rücken intratumoral entweder lösliches TNF (sTNF), TNF-Viruskonzentrat (Re.tmTNF) oder Kontrollviruskonzentrat (Re.pBabeNeo) injiziert. Die Tumoren wurden 24 h nach sTNFbzw. Virusinjektion entnommen und nach Anfertigung von Gefrierschnitten immunhistologisch auf Gefäßdichte und TNF-Expression untersucht.

Da auch einige unbehandelte Meth-A-Sarkome endogen TNF exprimieren, lässt im Tumor nachgewiesene TNF-Expression nur bedingt auf eine erfolgreiche Integration des retroviralen Genoms schließen (vgl. 3.3.1).

Dennoch war in diesem Versuch auffällig, dass bei allen Tumoren, die mit sTNF oder Re.tmTNF behandelt wurden, eine schwache oder starke Expression von TNF detektiert werden konnte (Abb. 3.7), wohingegen nur einer der 3 Tumoren der Kontrollgruppe schwach TNF-positiv war. Jeweils einer der untersuchten Tumoren der mit Re.tmTNF oder sTNF behandelten Gruppen wies Nekrosen auf, die etwa ein Sechstel der untersuchten Tumorschnittflächen einnahmen. In der mit dem Kontrollvirus Re.pBabeNeo behandelten Gruppe wurden hingegen in keinem der Tumoren Nekrosen entdeckt. Die Analyse der Morphometrie des Gefäßsystems ließ keine Unterschiede bezüglich der Vaskularisierung in den verschiedenen Gruppen feststellen (Daten nicht gezeigt).

In den untersuchten Tumoren war ein gewisser Zusammenhang zwischen der Stärke der TNF-Expression und Nekrosebildung zu erkennen. In zwei der drei Tumoren mit starker TNF-Expression ließen sich Nekrosen nachweisen, wobei in keinem der Tumoren, die keine oder eine geringe TNF-Expression zeigten, Nekrosen zu sehen waren.



Abb. 3.7: Immunhistologische Darstellung der TNF-Expression in Meth-A-Sarkomen nach intratumoraler Therapie 10 Tage nach Tumorzellinokulation.

Indirekte Immunfluoreszenz (TNFRI/Fc) auf Gefrierschnitten. A - C: Injektion von löslichem TNF. D - F: Injektion von Re.pBabeNeo.

3.3.3 Intratumorale Injektion von tmTNF-exprimierenden Retroviren in Meth-A-Sarkome mit anschließender intratumoralen Injektion von sTNF

Clauss, Sunderkotter et al. (2001) konnten zeigen, dass membranständiges TNF (tmTNF) für die VEGF-vermittelte endotheliale Hyperpermeabilität *in vitro* und *in vivo* unverzichtbar ist. Die Erhöhung der Tumorgefäßpermeabilität ist bei der Antitumortherapie von großer Bedeutung, da das eingesetzte Zytostatikum auf diese Weise leichter an den Wirkort, die Tumorzellen, gelangt (Yuan et al., 1998). Zusätzlich konnten bei Experimenten an Tumormodellen und bei der isolierten Extremitätenperfusion (vgl. 1.3.3.1) demonstriert werden, dass eine Zunahme der Gefäßpermeabilität im Tumor die Ausbildung von hämorrhagischen Nekrosen nach TNF- α -Applikation begünstigt (Shimomura et al., 1988; Nooijen et al., 1998).

In diesem Versuch sollte nun überprüft werden, ob die erhöhte TNF-Expression der Tumorendothelzellen durch gentherapeutische Vorbehandlung mit Re.tmTNF die nekrotisierende Wirkung von intratumoral injiziertem sTNF steigern kann.

Dazu wurde Meth-A-Sarkom-tragenden Mäusen 8 Tage nach Inokulation der Tumorzellen entweder Re.tmTNF oder Re.pBabeNeo intratumoral appliziert. Nach weiteren 48 h wurden die beiden Gruppe in 2 weitere unterteilt, von denen der einen intratumoral sTNF und der anderen als Negativkontrolle PBS injiziert wurde. Die Tumoren wurden 24 h nach sTNFbzw. PBS-Injektion entnommen. Bei den angefertigten Gefrierschnitten wurden anschließend mit Hilfe immunhistologischer Färbung die Gefäßdichte und die TNF-Expression untersucht.

Unabhängig von der Therapie war bei allen Tumoren nach immunhistologischer Färbung TNF-Expression auf den Endothelzellen zu sehen (Färbungen nicht gezeigt).

Bei der Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte fiel auf, dass fast alle Tumoren, die mit Re.tmTNF vorbehandelt wurden, größere Nekrosen aufzeigten (Abb. 3.8). Bei den Tieren, denen nach Behandlung mit Re.tmTNF sTNF injiziert wurde, wiesen alle Tumoren größere Nekrosen auf, die zwischen 21 % und 85 % der Tumorschnittflächen einnahmen. Ähnlich war es bei den Tumoren, die mit Re.tmTNF und PBS behandelt wurden. Hier fanden sich in zwei von drei Tumoren Nekrosen auf 14 bzw. 43 % der analysierten Tumorbereiche. Im Gegensatz hierzu zeigte die Gruppe, die mit dem Leervektor Re.pBabeNeo und anschließend mit sTNF behandelt wurde nur in einem der untersuchten Tumoren eine Nekrose. Sie nahm 46 % des Tumorquerschnittes ein. Bei der Kontrollgruppe, der Re.pBabeNeo und PBS injiziert wurde, ließ sich lediglich in einem Tumor eine winzige zentrale Nekrose (< 0,1 % der untersuchten Tumorschnittfläche) detektieren.

Injektion	Detektion	Tumor 1	Tumor 2	Tumor 3	
Re.tmTNF	TNF	+	++	++	
+ sTNF	Nekrose	21 %	27 %	85 %	
Re.tmTNF	TNF	++	++	++	
+ PBS	Nekrose	e 43 % 14 %		-	
Re.pBabeNeo	TNF	+	++	++	
+ sTNF	Nekrose	46 %	-	-	
Re.pBabeNeo	TNF	++	++	++	
+ PBS	Nekrose	0,1 %	-	-	

Die immunhistologische Untersuchung der Tumorschnitte mit einem anti-PECAM-I-Antikörper ließ in den Tumoren aller Gruppen eine vergleichbar gute Ausbildung von Blutgefäßen erkennen.

Tab. 3.2: Histologischer Befund nach Vorbehandlung der Tumoren mit Re.tmTNF und anschließender intratumoraler Applikation von sTNF.

Die TNF-Expression wurde semiquantitativ bewertet: - keine TNF-Expression nachweisbar, + mäßige TNF-Expression nachweisbar. Bei der Beurteilung der Nekrosen wurde der Anteil am gesamten Tumorquerschnitt bestimmt.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Injektion von Re.tmTNF die Ausbildung von Tumornekrosen induzieren kann. Es wurde auch beobachtete, dass dieser Effekt durch die zusätzliche intratumorale Injektion von löslichem TNF noch verstärkt wurde. Eine veränderte Gefäßmorphologie oder eine vermehrte Expression von TNF gegenüber den anderen Gruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden.



Abb. 3.8: Nekrosen in Meth-A-Sarkomen nach intratumoraler Gentherapie und anschließender intratumoraler Injektion von löslichem TNF bzw. PBS.

Hämatoxylin/Eosin gefärbte Gefrierschnitte. A - C: Injektion von Re.tmTNF und löslichem TNF. D - F: Injektion von Re.pBabeNeo und löslichem TNF. J - L: Injektion von Re.pBabeNeo und PBS. Die Pfeile markieren nekrotische Areale.

3.3.4 Intratumorale Injektion von tmTNF-exprimierenden Retroviren in Meth-A-Sarkome mit anschließender intraperitonealen Injektion von sTNF

Im vorangehenden Versuch (vgl. 3.3.3) induzierte die lokale Gabe von sTNF bei allen Mäusen, denen zuvor intratumoral Re.tmTNF injiziert wurde, die Ausbildung von Tumornekrosen. Da es in der Tumortherapie in der Regel einfacher ist das entsprechende Zytostatikum nicht lokal, sondern systemisch zu applizieren, wurde nun überprüft, ob die lokale Vorbehandlung der Tumoren mit Re.tmTNF die nekrotisierende Wirkung von sTNF auch bei dessen systemischer (intraperitonealer) Gabe verstärken kann.

Der Versuchsablauf war wie in 3.3.3 beschrieben, nur wurde den Tieren 48 h nach intratumoraler Re.tmTNF-Injektion sTNF bzw. PBS nicht intratumoral, sondern intraperitoneal injiziert.

Bei der immunhistologischen Untersuchung der Tumoren konnten in den verschiedenen Gruppen keine Unterschiede hinsichtlich der TNF-Expression festgestellt werden.

Bezüglich der Morphometrie des Gefäßsystems war zu erkennen, dass die Tiere, die zunächst intratumoral mit Re.tmTNF und dann anschließend mit sTNF behandelt wurden, im Durchschnitt die geringste Tumorgefäßdichte aufwiesen (Tab. 3.3 und Abb. 3.9). In dieser Gruppe konnten durchschnittlich 64 Gefäßanschnitte pro mm² gezählt werden. Der Anteil der Gefäßlumen am gesamten Tumorquerschnitt betrug im Durchschnitt 3,6 %. In den Tumoren der anderen Mäusen fiel die Zählung der Gefäße mit 98 bis 148 Gefäßanschnitten pro mm² etwa 2- bis 3 mal höher aus. Auch die Gefäßanschnittsfläche lag mit 4,4 bis 4,6 % des Gesamttumorquerschnittes etwas höher als in der ersten Gruppe. Dennoch war in allen Gruppen die Tumorvaskularisierung im Vergleich zu unbehandelten Tumoren, die 11 Tage nach Tumorinokulation geerntet wurden (vgl. 3.3.1), deutlich geringer entwickelt. Bei einem ähnlichem Anteil der Fläche der Gefäßanschnitte am gesamten Tumorquerschnitt zeigte sich vor allem eine eindeutig geringere Anzahl der Gefäßanschnitte.

Nekrosen fanden sich lediglich in zwei der Tumoren von Tieren, die mit der Kombinationstherapie aus Re.pBabeNeo und sTNF behandelt wurden. Die Größe der Nekrosen lag bei 6 bzw. 60 % des untersuchten Tumorquerschnitts.

Im Gegensatz zum vorherigen Versuch (vgl. 3.3.3), bei dem die intratumorale Injektion von sTNF keine Unterschiede in der Tumorgefäßmorphologie bewirkte, konnte in diesem Experiment durch die systemische Applikation von sTNF, bei intratumoralen Vorbehandlung mit Re.tmTNF, eine deutliche Reduktion der Gefäßdichte erzielt werden. Dennoch konnte in diesem Versuch kein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Gefäßdichte und der

ERGEBNISSE

Induktion von Tumornekrose festgestellt werden. Denn durch die Vorbehandlung der Tumoren mit Re.tmTNF konnte die tumornekrotisiernde Wirkung von sTNF nicht verstärkt werden. Keiner der Tumoren dieser Gruppe wies nekrotische Areale auf. Im Gegenteil fanden sich in den Mäusen, denen vor systemischer sTNF-Applikation intratumoral der Kontrollvirus Re.pBabeNeo injiziert wurde, in zwei der Tumoren deutlich nekrotische Bezirke.

Therapie	Anzahl der Tumoren	Mikrogefäße	Gefäßanschnittsfläche
		(pro mm²)	(in %)
Re.tmTNF + sTNF	3	64 ± 21	3,6 ± 3,5
Re.tmTNF + PBS	3	98 ± 81	4,4 ± 1,3
Re.pBabeNeo + sTNF	3	148 ± 77	4,6 ± 2,2
Re.pBabeNeo + PBS	3	101 ± 16	4,5 ± 0,8

Tab. 3.3: Histologischer Befund nach Vorbehandlung der Meth-A-Sarkome mit Re.tmTNF und anschließender intraperitonealer Applikation von sTNF.

In den verschiedenen Gruppen wurden die Anzahl der Mikrogefäße pro mm² eines Tumoranschnittes und die Summe der Gefäßanschnittsflächen bezogen auf den gesamten Tumorquerschnitt gemessen.



Abb. 3.9: Immunhistologische Darstellung der Tumorgefäßdichte in Meth-A-Sarkomen nach intratumoraler Gentherapie und anschließender intraperitonealen Injektion von löslichem TNF bzw. PBS.

Indirekte Immunfluoreszenz gegen PECAM-1 (Mec 13.3) auf Gefrierschnitten. A - C: Injektion von Re.tmTNF und löslichem TNF. D - F: Injektion von Re.tmTNF und PBS. G - I: Injektion von Re.pBabeNeo und löslichem TNF. J - L: Injektion von Re.pBabeNeo und PBS.

3.3.5 Intratumorale Injektion von tmTNF-exprimierenden Retroviren in B16-Melanome

Das maligne Melanom ist eine von epidermalen Melanozyten ausgehende Neoplasie und gilt als der bösartigste Tumor der Haut, da er frühzeitig lymphogen und hämatogen metastasiert. Seit der Erstpublikation durch Liénard und Lejeune 1992 werden bei Patienten mit *in-transit*-Melanommetastasen isolierte Extremitätenperfusionen (vgl. 1.3.3.1) unter Verwendung von TNF- α und Zytostatika vorgenommen. Die hohen Raten kompletter Remissionen haben zu einer intensiven Erprobung dieser Therapie geführt. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob tmTNF-exprimierende Retroviren Tumorendothelzellen von B16-Melanomen infizieren können.

Hierzu wurde Mäusen 8 Tage nach intrakutaner Inokulation von B16-Melanomzellen auf den Rücken entweder Re.tmTNF oder Re.pBabeNeo intratumoral injiziert. Die Tumoren wurden 4 Tage nach Virusinjektion entnommen und nach Herstellung von Gefrierschnitten histologisch auf TNF-Expression und Nekrosen analysiert. Zusätzlich wurden unbehandelte B16-Melanome untersucht, die 12 Tage nach Tumorzellinokulation geerntet wurden.

Die immunhistologische Untersuchung der Tumorblutgefäße ergab, dass die Tumoren aller ähnlich gut vaskularisiert waren (Daten nicht gezeigt). Hilfe Gruppen Mit immunhistologischer TNF-Färbung (Abb. 3.10; Tab. 3.4) konnte bei allen Tumoren unabhängig von der Therapie TNF-Expression detektiert werden, wobei bei zwei Tumoren aus der Gruppe, die mit Re.tmTNF behandelt wurden, die TNF-Expression deutlich stärker ausfiel als in den übrigen Tumoren. Es war eindeutig zu erkennen, dass das TNF-Protein vor allem von den Tumorendothelzellen exprimiert wurde. Praktisch in allen Tumoren, in die Viruskonzentrat injiziert wurde, konnten Nekrosen festgestellt werden (Abb. 3.11). In der Gruppe, die mit Re.tmTNF behandelt wurde, zeigten zwei von drei Tumoren Nekrosen, die 6 bzw. 9 % der untersuchten Tumorschnittfläche einnahmen. Bei den Mäusen, die mit dem Re.pBabeNeo behandelt wurden, wurde sogar in allen Tumoren Nekrosen detektiert. Sie nahmen 4, 8 bzw. 33 % der untersuchten Tumorschnittfläche ein. In der Gruppe der unbehandelten Tiere konnte lediglich in einem Tumor eine sehr kleine Nekrose (1 % des untersuchten Tumorschnittes) nachgewiesen werden.

Die erhöhte TNF-Expression in den Tumoren, die mit Re.tmTNF behandelt wurden, lässt folgern, dass eine Integration der retroviralen DNS in das Genom der Tumorendothelzellen mit anschließender TNF-Expression erfolgen kann. Dennoch scheint die Ausbildung von

Therapie	Detektion	Tumor 1	Tumor 2	Tumor 3	
Re.tmTNF	TNF	+	++	++	
	Nekrose	-	6 %	9 %	
Re.pBabeNeo	TNF	+	+	+	
	Nekrose	33 %	8 %	4 %	
unbehandelt	TNF	+	+	+	
	Nekrose	1 %	-	-	

Nekrosen im B16-Melanom unabhängig von der Höhe der TNF-Expression zu sein, da schon alleine die Injektion von Viruskonzentrat zu Tumornekrosen führt (Abb. 3.11 D - F).

Tab.3.4:HistologischerBefundinB16-MelanomennachintratumoralerGentherapie8TagenachTumorzellinokulation.

Die TNF-Expression wurde semiquantitativ bewertet: - keine TNF-Expression nachweisbar, + mäßige TNF-Expression nachweisbar. Bei der Beurteilung der Nekrosen wurde der Anteil am gesamtem Tumorquerschnitt bestimmt.



Abb. 3.10: Immunhistologische Darstellung der TNF-Expression in B16-Melanomen nach intratumoraler Gentherapie 8 Tage nach Tumorzellinokulation.

Indirekte Immunfluoreszenz (TNFRI/Fc) auf Gefrierschnitten. A, B: Injektion von Re.tmTNF. C, D: Injektion von Re.pBabeNeo. E, F: unbehandelt. A, C, E: 10-fach vergrößert. B, D, F: 20-fach vergrößert



Abb. 3.11: Nekrosen in B16-Melanomen nach intratumoraler Gentherapie 8 Tage nach Tumorzellinokulation. Hämatoxylin/Eosin gefärbte Gefrierschnitte. A - C: Injektion von Re.tmTNF. D - F: Injektion von Re.pBabeNeo. G - I: unbehandelt. Die Pfeile markieren nekrotische Areale.

3.3.6 Intratumorale Injektion von tmTNF-exprimierenden Retroviren in B16-Melanome mit anschließender intraperitonealen Injektion von sTNF

Auf Grund des vorangegangenen Versuches (vgl. 3.3.5) kann davon ausgegangen werden, dass die Endothelzellen von B16-Melanomen durch Re.tmTNF infiziert werden können, was anschließend zu einer Hochregulation von TNF auf dem Tumorendothel führt. Nun sollte untersucht werden, ob die Erhöhung der TNF-Expression auf dem Tumorendothel das B16-Melanom für eine anschließende systemische Behandlung mit löslichem TNF- α sensibilisieren kann.

Zu diesem Zweck wurde Mäusen 11 Tage nach intrakutaner Inokulation von B16-Melanomzellen auf den Rücken entweder Re.tmTNF oder Re.pBabeNeo intratumoral injiziert. Die beiden Gruppen wurden 48 h nach Injektion des Viruskonzentrats in 2 weitere Gruppen unterteilt, von denen der einen intraperitoneal sTNF und der anderen PBS gespritzt wurde. Die Tumoren wurden 24 h nach sTNF- bzw. PBS-Inokulation entnommen.

Bei der immunhistologischen Färbung der Tumorschnitte zeigte sich, dass die TNF-Expression in den Gruppen stärker war, die mit Re.tmTNF vorbehandelt wurden (Tab. 3.6). In diesen Gruppen konnte bei allen Tumoren TNF auf der Oberfläche der Tumorendothelzellen detektiert werden. In jeweils einem Tumor der beiden Gruppen konnte sogar eine sehr starke Expression von TNF ermittelt werden. Bei den Tumoren der Gruppen, die mit einer intratumoralen Injektion von Re.pBabeNeo vorbehandelt wurden, konnte in 6 der 9 Tumoren eine schwache Expression von TNF nachgewiesen werden. Die übrigen 3 Tumoren waren TNF-negativ.

Nekrosen konnten in allen Tumoren detektiert werden, die systemisch mit sTNF behandelt wurden (Tab 3.6). Dabei waren bei den Tieren, die mit Re.tmTNF vorbehandelt wurden im Durchschnitt 42 % der untersuchten Tumorquerschnitte nekrotisch. Bei der Gruppe, die mit dem Kontrollvirus Re.pBabeNeo vorbehandelt wurde, lag dieser Wert mit 38 % in einem ähnlichen Bereich. Im Gegensatz hierzu wurden bei den Mäusen die mit Re.tmTNF und PBS therapiert wurden nur bei 3 der 5 Tiere Nekrosen gefunden, die zwischen 12 und 82 % der untersuchten Tumorquerschnitte einnahmen. Die Tumoren der Tiere, denen nach intratumoralen Injektion von Re.pBabeNeo systemisch PBS appliziert wurde, waren alle frei von Nekrosen.

Injektion	Detektion	Tumor 1	Tumor 2	Tumor 3	Tumor 4	Tumor 5	Mittelwert
Re.tmTNF	TNF	+	++	+	+		
+ sTNF	Nekrose	35 %	12 %	58 %	63 %		42 %
Re.tmTNF	TNF	+	++	+	+	+	
+ PBS	Nekrose	-	-	16 %	12 %	82 %	22 %
Re.pBabeNeo	TNF	-	-	+	+	+	
+ sTNF	Nekrose	14 %	86 %	62 %	26 %	4 %	38 %
Re.pBabeNeo	TNF	-	+	+	+		
+ PBS	Nekrose	-	-	-	-		0 %

Tab. 3.5: Histologischer Befund nach Vorbehandlung der Meth-A-Sarkome mit Re.tmTNF und anschließender intraperitonealen Applikation von sTNF.

Die TNF-Expression wurde semiquantitativ bewertet: - keine TNF-Expression nachweisbar, + mäßige TNF-Expression nachweisbar. Bei der Beurteilung der Nekrosen wurde der Anteil am gesamtem Tumorquerschnitt bestimmt.

Bei den Tumoren der verschiedenen Gruppen konnten nur geringe Unterschiede der Vaskularisierung festgestellt werden (Abb. 3.12). Die Tumorgefäßdichten der ersten 3 Gruppen lagen mit von 110 bis 117 Gefäßanschnitten pro mm² etwas höher als die der Gruppe, die weder mit Re.tmTNF noch mit sTNF behandelt wurde. Hier lag die durchschnittliche Tumorgefäßdichte bei 84 Gefäßanschnitten pro mm².



Abb. 3.12: Anzahl der Gefäßanschnitte pro mm² in einem Tumorabschnitt höchster Gefäßdichte nach Therapie mit Re.tmTNF und sTNF.

Bei den Tumoren der Mäuse, die zunächst intratumoral mit dem tmTNF-Virus und anschließend intraperitoneal mit sTNF behandelt wurden, nahmen die Tumorgefäße 1,7 % des Tumorquerschnitts ein. Im Vergleich hierzu lag bei den Tumoren der Gruppe, die zunächst mit dem Kontrollvirus Re.pBabeNeo und dann mit PBS behandelt wurde, dieser Wert mit 2,5 % etwa 50 % höher. Die beiden anderen Gruppen (Re.tmTNF + PBS und Re.pBabeNeo + sTNF) lagen mit 2,4 % bzw. 2,0 % dazwischen (Abb. 3.13).



Abb. 3.13: Anteil der Gefäßanschnitte in % am Tumorquerschnitt in einem Tumorabschnitt höchster Gefäßdichte nach Therapie mit Re.tmTNF und sTNF.

Die Auswertungen des Experimentes bestätigte, dass eine systemisch Applikation von sTNF in B16-Melanomen zu einer vermehrten Ausbildung von Nekrosen führt. Bei allen Tumoren, die intraperitoneal mit sTNF behandelt wurden, konnten Tumornekrosen detektiert werden. Auch die alleinige intratumorale Injektion von Re.tmTNF führte in 3 von 5 Tumoren zu Nekrosen, wohingegen die Injektion von Re.pBabeNeo mit anschließender systemischer Gabe von PBS in keinem der untersuchten Tumoren Nekrosen induzieren konnte.

Entgegen der Erwartungen waren die Gefäße in den mit Re.tmTNF + löslichen TNF behandelten Tumoren verzweigter und weniger geweitet gegenüber den Kontrolltumoren (Re.pBabeNeo + PBS) (s. Abb. 3.13).

3.3.7 Dosis-abhängige Wirkung von Melphalan auf das Meth-A-Sarkom

Melphalan ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylanzien. Da bei *in vitro-* und *in vivo-*Studien Synergismen zwischen der antitumoralen Wirkung von Melphalan und TNF festgestellt werden konnten (Manusama, Nooijen et al., 1996; Manusama, Stavast et al., 1996; Nooijen, Manusama et al., 1996), sollte nun untersucht werden, ob die tumorhemmende Aktivität von Melphalan durch eine gentherapeutische Vorbehandlung der Meth-A-Sarkome mit Re.tmTNF verstärkt werden kann. Um zunächst zu untersuchen, in welchen Konzentrationen Melphalan alleine im Meth-A-Sarkom zytostatisch wirkt, wurde Melphalan in steigenden Dosen intraperitoneal in tumortragende Mäuse injiziert. Im nächsten Experiment sollte dann geprüft werden, ob sich die zuvor ermittelte wirksame Minimaldosis von Melphalan durch intratumorale Vorbehandlung der Tumoren mit Re.tmTNF verringern lässt.

Für die Dosis-Kinetik wurde Mäusen jeweils 2 Tumoren intrakutan auf die Flanken injiziert. Nachdem die Mäuse 3 Tage nach Inokulation der Tumorzellen zufällig in 5 Gruppen geteilt wurden, wurde ihnen 1 mg, 2,5 mg, 5 mg bzw. 10 mg Melphalan pro kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Einer Kontrollgruppe wurde intraperitoneal PBS injiziert. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Tumoren entnommen und gewogen.

Bei der Quantifizierung der Tumorvaskularisierung ließen sich nur geringe Unterschiede in Abhängigkeit von der applizierten Melphalandosis feststellen (Abb. 3.14). In den Gruppen, die zwischen 0 mg und 5 mg Melphalan pro kg Körpergewicht erhielten, konnten im Durchschnitt zwischen 104 und 115 Gefäßanschnitte pro mm² gezählt werden. Bei der Gruppe, die 10 mg Melphalan pro kg Körpergewicht erhielt, war die Tumorgefäßdichte mit im Durchschnitt 92 Tumorgefäßanschnitten pro mm² 20 % geringer als die der mit PBS behandelten Gruppe.

Obwohl die Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte ergab, dass alle Tumoren frei von Nekrosen waren, ließen sich signifikante Unterschiede in der Tumormasse in Abhängigkeit von der verabreichten Melphalandosis feststellen (Abb. 3.15). Während Tumoren der Gruppe 1 (1 mg Melphalan pro kg Körpergewicht) am Ende der Therapie mit im Durchschnitt 202 mg ähnlich viel wogen wie die mit PBS-behandelten Tiere (206 mg im Durchschnitt), war das Tumorgewicht der Gruppe 4 (10 mg Melphalan pro kg Körpergewicht) mit 113 mg im Durchschnitt 44 % geringer. Das durchschnittliche Tumorgewicht lag in den Gruppen 2 (2,5 mg Melphalan pro kg Körpergewicht) und 3 (5 mg Melphalan pro kg Körpergewicht) mit im Durchschnitt 188 mg bzw. bei 138 mg zwischen den beiden anderen Gruppen.



Abb. 3.14: Anzahl der Gefäßanschnitte pro mm² in einem Tumorabschnitt höchster Gefäßdichte nach Therapie mit Melphalan.

3 Tage nach intrakutaner Inokulation der Tumorzellen in c57/Bl6-Mäuse wurde den Tieren 1 mg, 2,5 mg, 5 mg bzw. 10 mg Melphalan pro kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Einer Kontrollgruppe wurde intraperitoneal PBS injiziert.



Abb. 3.15: Dosis-abhängige Wirkung von Melphalan auf das Tumorwachstum am Modell des Meth-A-Sarkoms.
3 Tage nach intrakutaner Inokulation der Tumorzellen in c57/Bl6-Mäuse wurde den Tieren 1 mg, 2,5 mg, 5 mg bzw. 10 mg Melphalan pro kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Einer Kontrollgruppe wurde intraperitoneal PBS injiziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Melphalan bei nur schwachem antiangiogenem und fehlendem nekrotisierendem Effekt, in Abhängigkeit von der applizierten Dosis das Tumorwachstum der Meth-A-Sarkome hemmte. Jedoch induzierte eine Dosis von 10 mg Melphalan pro kg Körpergewicht bereits hohe toxische Nebenwirkungen, was sich symptomatisch als Haarausfall bei 2 von 3 Mäusen manifestierte.

3.3.8 Intratumorale Injektion von tmTNF-exprimierenden Retroviren in Meth-A-Sarkome mit anschließender intraperitonealen Injektion von Melphalan

Im vorherigen Versuch induzierte die Injektion von 10 mg Melphalan pro kg Körpergewicht neben einer Hemmung des Tumorwachstums auch starke toxische Nebenwirkungen (Ausfall der Kopfhaare) bei 2 Tieren (vgl. 3.3.7).

Durch intratumorale Injektion von tmTNF-exprimierenden Retroviren und anschließender intraperitonealen Injektion von Melphalan wurde nun geprüft, ob die präaktivierende Wirkung von TNF auf das Tumorendothel dazu führt, dass die Gabe der Dosis von 5 mg Melphalan pro kg Körpergewicht, eine deutlichere Hemmung des Tumorwachstums bewirkt als in dem vorangehenden Experiment.

Dazu wurden Mäusen jeweils 2 Tumoren intrakutan auf die Flanken injiziert. Den Mäusen wurde 8 Tage nach Inokulation der Tumorzellen entweder Re.tmTNF oder Re.pBabeNeo intratumoral injiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurde jede Gruppe in 2 weitere unterteilt, denen intraperitoneal 5 mg Melphalan pro kg Körpergewicht bzw. PBS injiziert wurde. Da die Tumoren *in situ* nicht gewogen werden können, wurden sie täglich mit Hilfe einer Schieblehre gemessen. 12 Tag nach Melphalan- bzw. PBS-Gabe wurden die Tumoren entnommen.



Abb. 3.16: Intratumorale Injektion von Re.tmTNF mit anschließender intraperitonealen Injektion von Melphalan.

Beim Verlauf des Tumorwachstums zeigten sich in den verschiedenen Gruppen keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 3.16). Zu Beginn der Therapie lag der durchschnittliche Tumorquerschnitt bei allen Gruppen zwischen 34 und 46 mm², am Ende der Therapie zwischen 132 und 157 mm². Die geringste Größenzunahme war in den beiden Gruppen festzustellen, die intratumoral mit Re.tmTNF vorbehandelt wurden (Abb. 3.17). In der Gruppe 1 (Re.tmTNF + Melphalan) hatten die Tumoren bei Therapiebeginn eine durchschnittliche Tumorgröße von 50 mm² und sie hatten sich am Ende der Therapie mit einer Tumorgröße von im Durchschnitt 157 mm² um etwa 240 % vergrößert. Ähnlich war der Verlauf bei den Tumoren der Gruppe 2 (Re.tmTNF + PBS), deren durchschnittliche Tumorgröße bei Therapiebeginn bei 44 mm² lag und auch um etwa 240 % auf 150 mm² zunahm. Das stärkste Tumorwachstum zeigte sich in der Gruppe, die mit Re.pBabeNeo und Melphalan therapiert wurde. Hier lag zu Beginn die durchschnittliche Tumorgröße bei 36 mm² und diese erreichte am Ende der Therapie mit 165 mm² einen Wert, der 350 % höher lag. Die Tumoren der 4. Gruppe (Re.pBabeNeo + PBS) wuchsen von im Durchschnitt von 35 mm² auf eine durchschnittliche Endgröße von 132 mm². Die Größenzunahme lag damit bei etwa 280 %.



Abb. 3.17: Intratumorale Injektion von Re.tmTNF mit anschließender intraperitonealen Injektion von Melphalan.

Die tumorhemmende Eigenschaft von Melphalan, wie sie im vorherigen Versuch demonstriert wurde (vgl. 3.3.7), konnte in diesem Experiment nicht bestätigt werden. In den Gruppen, denen intratumoral der Kontrollvirus Re.pBabeNeo injiziert wurde, zeigten die Tumoren, die systemisch mit Melphalan therapiert wurden, sogar ein stärkeres Tumorwachstum als jene, denen lediglich PBS intraperitoneal gespritzt wurde. Allerdings konnte eine gewisse Hemmung des Tumorwachstums durch die intratumorale Injektion von Re.tmTNF dargestellt werden. Beide Gruppen, die intratumoral Re.tmTNF erhielten, hatten, verglichen mit den Gruppen, denen Re.pBabe Neo injiziert wurde, eine geringere Größenzunahme. Diese war unabhängig davon, ob den Tieren im Anschluss systemisch Melphalan appliziert wurde oder nicht. Es zeigte sich also kein Synergismus zwischen der wachstumshemmenden Wirkung von Re.tmTNF und Melphalan.

4 Diskussion

4.1 TNF-α als antineoplastische Substanz

Seit Mitte der Achtziger wird TNF aufgrund seiner antineoplastischen Eigenschaften in der Tumortherapie eingesetzt. TNF wirkt allerdings nicht auf alle Tumorzelllinien zytotoxisch, auf einige wirkt es lediglich wachstumshemmend ohne die Tumorzelle zu zerstören. In den meisten Zellen jedoch wird durch TNF- α *in vitro* nicht einmal das Zellwachstum gehemmt. Der zytostatische Effekt auf Tumorzellen wird hauptsächlich durch einen komplexen Mechanismus vermittelt, der zur Induktion von Apoptose in der Zielzelle führt. Obwohl die Signalwege, die zum Zelltod führen, in den letzten Jahren detailliert charakterisiert wurden, ist immer noch nicht völlig klar, warum einige Tumorzellen gegenüber der antitumoralen Eigenschaft von TNF resistent sind. Eine Erklärung wurde durch die Beobachtung geliefert, dass einige Zellen mit Mutationen in Proteinen mit zentraler Bedeutung im Apoptose-Mechanismus vor dem Zelltod geschützt sind.

Bei der selektiven Wirkung von TNF auf die Tumorgefäße des Meth-A-Sarkoms spielt die prokoagulatorische Aktivierung des Tumorendothels scheinbar eine bedeutende Rolle, da der Hemmer antitumorale Effekt von TNF durch Gerinnungshemmer und der Plättchendegranulation (Manda, Shimomura et al., 1987) gehemmt werden kann. Die hohe Sensitivität des Meth A Tumors gegenüber TNF ist aber auch durch die hohe Immunogenität des Tumors bedingt (Palladino et al., 1987), denn Tumorregression und die Induktion von hämorrhagischen Nekrosen wurden als von T-Zellen abhängigen Immunreaktionen beschrieben (Havell et al., 1988; North & Havell, 1988). Dies wird unter anderem durch die Tatsache bekräftigt, dass sowohl in nicht-immunogenen Tumoren als auch in Tumoren, die Nacktmäusen injiziert wurden, verglichen mit immunogenen Tumoren und Tumoren immunkompetenter Mäuse. reduzierte hämorrhagische Nekrosen und reduzierte Langzeitüberlebensraten beobachtet wurden (Haranaka et al., 1984). Diese Entdeckung steht in Einklang mit der Theorie von Endothelzellaktivierung und der durch Adhäsionsproteine und Chemokine kontrollierten Extravasation von Leukozyten als Voraussetzung für die Induktion von Tumornekrose. Es ist daher anzunehmen, dass der größere Erfolg der TNF-Therapie in murinen Tumormodellen gegenüber der klinischen Erprobungen bei Menschen durch das Fehlen von Immunität in den meisten humanen Tumoren bedingt ist. Nach der Beobachtung, dass sich nach Infusion von TNF in Meth A Tumor-tragenden Mäusen intravasale Fibrinablagerungen in den Tumorgefäßen jedoch nicht in den übrigen Gefäßen finden (Nawroth et al., 1988), konnten drei verschiedene Polypeptide aus Meth A

Zellüberstand isoliert werden (Clauss et al., 1990a; 1990b; Kao et al., 1992). Diese Polypeptide steigerten die prokoagulatorische Eigenschaften des Tumorendothels durch Induktion von Gewebsthromboplastin. Da sie auch eine chemotaktische und Monozytenaktivierende Wirkung zeigten, wurden diese Faktoren als endotheliale Monozytenaktivierende Polypeptide (EMAPs) bezeichnet. EMAP II wird bei Apoptose in Tumorzellen freigesetzt und kann hämorrhagische Nekrosen durch die Anlockung von Leukozyten verstärken (Kao et al., 1992; Nawroth et al., 1988). Die Bildung von EMAP II wird auch durch Hypoxie induziert. So findet sich EMAP II in mit TNF-a behandelten Meth-A-Sarkomen und B16-Melanomen insbesondere in der Nähe nekrotischer Areale hochreguliert (Matschurat et al., 2003). Ein weiteres Protein, das an der Endothelsensibilisierung mitwirkt, ist das membranständige Vorläufermolekül (tmTNF) des löslichen TNF. TmTNF ist selektiv in den Blutgefäßen des Meth-A-Sarkoms hochreguliert und ist essentiell für die durch VEGF induzierte Hyperpermeabilität der Tumorblutgefäße (Clauss et al., 2001). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die vermehrte Bildung von tmTNF durch die Tumorendothelzellen die Aktivität von Tissue Factor erhöht (A. Willuweit, Dissertation 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Injektion von Re.tmTNF in Meth A Tumor-tragende Mäuse die Ausbildung von zentralen Tumornekrosen induziert. Auch wenn in dieser Arbeit mit Melphalan keine Erfolge erzielt werden konnten, könnte die endothelzellaktivierende Potenz von tmTNF in Kombination mit anderen Zytostatika für die Therapie des Meth-A-Sarkoms und vielleicht auch anderer Tumoren eine Bedeutung erlangen.

4.2 Klonierung der cDNS von murinem membranständigen TNF-α

Gentherapie ist der Transfer genetischen Materials in Zellen eines Individuums mit dem Ziel einen therapeutischen Nutzen für den Patienten zu erzielen. Die gegenwärtigen Gentherapieverfahren sind hauptsächlich *ex vivo*-Verfahren, bei denen aus dem Patienten Zellen isoliert, im Labor modifiziert und dem Patienten reimplantiert werden. Viele angeborene oder erworbene Erkrankungen treten jedoch in Zellen oder Organen auf, die sich nicht entfernen, kultivieren, modifizieren und reimplantieren lassen. In diesen Fällen ist es angebracht, dem Patienten die Vektoren lokal oder systemisch zu verabreichen und die Infektion *in vivo* ablaufen zu lassen (Mulligan et al., 1993; Miller et al., 1992).

In klinischen Studien kommen beim Gentransfer Retroviren, Adenoviren und Plasmid-Liposom-Komplexe als Vektoren zur Anwendung. Da sie das therapeutische Gen durch

unterschiedliche Mechanismen transferieren, haben sie für verschiedene Anwendungsbereiche jeweils Vor- und Nachteile (Boris-Lawrie und Temin, 1994). So versucht man derzeit zur hereditärer und chronischer Funktionsstörungen retrovirale Vektoren Behandlung einzusetzen. Replikationsdefiziente rekombinante retrovirale Vektoren können bis zu 9 kb exogener Information speichern. Sie transferieren ihre genetische Information in das Genom der Zielzelle, wodurch der Genotyp der Zielzelle theoretisch dauerhaft modifiziert wird (Temin, 1990). Eine große Gefahr bei der Verwendung retroviraler Vektoren besteht zum einen in der Möglichkeit, dass sich vermehrungsfähige Viren bilden, zum anderen, dass sie zu multiplen Integrationen in das Genom der Zielzelle führen. Dies ist besonders bedrohlich, wenn die provirale DNS zufällig ein Tumorsupressorgen unterbricht oder ein Onkogen aktiviert. Die klinische Anwendung retroviraler Vektoren wird durch weitere Faktoren limitiert. Retroviren können nur sich teilende Zellen infizieren, da das Auflösen der Kernmembran während der Mitose eine Voraussetzung für die Integration der proviralen genetischen Information in das Wirtsgenom darstellt. Sie sind außerdem empfindlich gegenüber Inaktivierung durch das Komplementsystem, und die viralen Titer sind oftmals nicht ausreichend für eine effiziente Infektion der Zielzelle (Temin, 1990). Retrovirale Vektoren werden daher beim Menschen fast ausschließlich in ex vivo-Gentherapien eingesetzt.

Adenoviren werden hingegen überwiegend im *in vivo*-Transfer verwendet. Sie können in hohen Titern (bis zu 10¹³ viraler Partikel pro ml) produziert werden und können Gene effizient in replizierende und nicht-replizierende Zellen integrieren (Rosenfeld et al., 1991). Die übertragene genetische Information bleibt dabei epichromosomal, wodurch das Risiko einer ständigen Alteration des zellulären Genotyps und das Auftreten von Insertionsmutationen unterbunden wird. Die Verwendung adenoviraler Vektoren wird jedoch durch die Induktion nicht-spezifischer Entzündungsreaktionen und gegen den Vektor gerichtete zelluläre Immunabwehr limitiert (Wickham et al., 1993).

Plasmid-Liposom-Komplexe haben als Gentransfersysteme verschiedene Vorteile gegenüber anderen Vektoren. Sie können Gene unlimitierter Größe transferieren, sie replizieren und rekombinieren nicht zu gefährlichen Partikeln und da sie keine Proteine besitzen, lösen sie kaum Entzündungsreaktionen aus (Farhood et al., 1994). Der entscheidende Nachteil dieser Vektoren liegt jedoch darin, dass der Zielzelle tausende von Plasmiden präsentiert werden müssen, um einen erfolgreichen Gentransfer zu erzielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für den *in vivo*-Gentransfer der auf der Grundlage des Maus-Leukämie-Virus (MLV) entwickelte retrovirale Vektor *pBabe Neo*, in den die cDNS

von murinem tmTNF kloniert wurde, verwendet. Zur Verpackung des retroviralen Genoms diente die Zelllinie GP+E86. Diese Verpackungszelllinie ist zur Produktion ecotroper (nagerspezifischer) helfervirusfreier Virusüberstände geeignet, da die für die Replikation notwendigen Gene (ψ -Motiv und 3'LTRs) aus dem Genom entfernt wurden. Essentielle Gensequenzen wie gag, pol und env wurden auf zwei verschiedenen Plasmiden in die Zellen integriert, so dass diese in der Lage sind, infektiöse, aber replikationsdefiziente Viren zu produzieren.

4.3 In vitro-Analyse der transfizierten GP+E86-Zellklone

4.3.1 TNF-induzierte endotheliale Gerinnungsaktivität

Da die Stimulation von TNF-Rezeptoren auf HUVEC zu einer gesteigerten Expression von Gewebsthromboplastin führt (Clauss et al., 1990), wurde die biologische Aktivität der mit tmTNF transfizierten GP+E86-Zelllinien mit Hilfe eines Gerinnungstests ermittelt (vgl. 3.2.1). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die GP+E86-Zellklone, die für tmTNF kodierten in der Lage waren, die TNF-vermittelte Gewebsthromboplastin-Expression in HUVEC zu verstärken. Zwar besaßen sie nicht die Gewebsthromboplastin-induzierende Potenz von sTNF, sie wirkten dennoch etwa 50 bis 80fach stärker gerinnungsfördernd als die GP+E86-Zellklone, die lediglich mit dem Leervektor transfiziert waren. Die gerinnungsfördernde Aktivität der mit dem Leervektor-GP+E86-Zellen stimulierten HUVEC lag im Bereich der unstimulierten HUVEC (Negativkontrolle).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das tmTNF-Gen nicht nur erfolgreich in das Genom der virusverpackenden Zelllinien integriert wurde, sondern auch, dass das TNF-Protein von diesen Zellen synthetisiert und auf der Zelloberfläche exprimiert wurde.

4.3.2 Expression retroviraler Vektoren

Um zu bestätigen, dass die verwendeten virusverpackenden Zelllinien tatsächlich infektiöse retrovirale Partikel freisetzen, wurden Titerbestimmungen durchgeführt (vgl. 2.4.4). Dabei konnten im Überstand der Leervektorzellen GP+E86.pBabeNeo mit ungefähr 8 x 10⁶ cfu/ml etwa 4mal so viele infektiöse Partikel detektiert werden wie im Überstand der tmTNF-transfizierten Zellen GP+E86.tmTNF (vgl. 3.2.1). Es zeigten sich auch Unterschiede der beiden Zelllinien in der Zeitdauer, die benötigt wurde, um den maximalen Virustiter zu

erreichen. Im Überstand der GP+E86.tmTNF-Zellen stieg der Virustiter kontinuierlich an bis er nach Erreichen des maximalen Wertes nach 96 h wieder abfiel. Der höchste Virustiter im Zellüberstand der GP+E86.pBabeNeo-Zellen stellte sich hingegen bereits nach 72 h ein. Eine Erklärung für den langsameren Anstieg des viralen Titers und die geringere maximal erreichte Virusmenge im Überstand der Re.tmTNF-exprimierenden GP+E86-Zellen könnte das auf der Zellmembran exprimierte tmTNF sein, das zytotoxisch auf die Nachbarzellen wirkt und dadurch den Proteinstoffwechsel dieser Zellen und somit auch die Bildung retroviraler Vektoren hemmt.

4.3.3 Erhöhung des retroviralen Titers

Der Hauptvorteil, den Retroviren gegenüber anderen viralen Vektoren besitzen, ist die Fähigkeit, eine langanhaltende Transduktion des Zielorgans zu erzielen. Dennoch ist die Virusmenge, die durch die virusverpackenden Zellen produziert wird, häufig nicht ausreichend, um eine therapeutisch wirksame Infektion der Zielzellen zu bewirken. Eine Möglichkeit, das Infektionsspektrum *in vitro* zu vergrößern, ist die gemischte Infektion von Zielzellen mit retroviralen Vektoren und defekten Adenoviren (Adams et al., 1995). Da der adenovirale Rezeptor auf den Zielzellen im Überfluss vorhanden ist, ist es für das Adenovirus einfacher als für das Retrovirus, dessen Rezeptoren offensichtlich nur in begrenzter Anzahl und auch nur zu bestimmten Zeitpunkten vorhanden sind, an seinen Rezeptor zu binden. Das Adenovirus scheint dann beim Eindringen in die Zelle den retroviralen Vektor mit hineinzuschleusen. Die mit diesem System erzielten infektiösen Titer sind jedoch für die klinische Anwendung immer noch zu niedrig.

Eine weitere Möglichkeit eine Erhöhung der Titer retroviraler Vektoren zu erzielen, ist die Konzentration der Viren durch Zentrifugation. Um für die *in vivo*-Experimente höchstmögliche retrovirale Titer zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Protokolle, die die retrovirale Konzentration durch Zentrifugation beschreiben, miteinander verglichen (vgl. 3.3). Bei der Methode nach Cepko et al. (1989) wurde der Überstand der virusverpackenden Zellen erst 20 min und dann noch einmal 2 h bei 20000 UpM zentrifugiert. Hierbei wurde der virale Titer beim GP+E86-tmTNF-Zellklon im Durchschnitt um das 60fache und beim GP+E86-pBabeNeo-Zellklon um das 35fache erhöht. Im Gegensatz hierzu wurde der Zellüberstand in dem Protokoll nach Bowles et al. (1996) bei nur 6000 UpM für 16 h zentrifugiert. Der hierbei durchschnittlich erreichte Virustiter lag bei beiden virusverpackenden Zelllinien etwa 80mal höher als vor Konzentrierung der Viren.

Eine Erklärung dafür, dass bei der letzteren Methode Titer erzielt werden konnten, die etwa doppelt so hoch lagen wie bei der ersten Methode, könnte die Tatsache sein, dass die Infektiosität der retroviralen Vektoren durch die physikalische Schädigung, die die Retroviren durch Ultrazentrifugation erleiden, stark vermindert wird. Ein weiterer Nachteil der Ultrazentrifugation ist der Umstand, dass hiermit nur sehr geringe Mengen Zellüberstand zentrifugiert werden können. Aus diesen Gründen wurden die Viruskonzentrierungen für die anschließenden *in vivo*-Versuche stets nach dem Protokoll von Bowles et al. durchgeführt.

4.4 Retrovirale Gentherapie mit tmTNF

4.4.1 Retrovirale Infektion von Tumor- und Endothelzellen

Mittels retroviraler Vektoren können Zellen infiziert werden, in deren Genom sich dann die retrovirale cDNS stabil integriert. Retrovirale Gentherapie bietet somit die Möglichkeit, eine anhaltende therapeutische Freisetzung von aktiven Substanzen zu erzielen. Wenn das therapeutische Gen für ein giftiges Genprodukt kodiert oder für ein Gen, das eine Sensitivität gegenüber Vorläufersubstanzen vermittelt, ist es wichtig, dass das therapeutische Gen gezielt exprimiert wird (Moolten et al., 1994). Da der in retroviralen Vektoren häufig verwendete MLV-Promotor unspezifisch in vielen verschiedenen Zellarten zur Expression von nachgeschalteten Genen führt, können gewebespezifische regulatorische Elemente entweder an Stelle der Regulationselemente des MLV-Promotors oder zusätzlich im zentralen Bereich des retroviralen Vektors eingebaut werden.

Ein Beispiel ist der Tyrosinase-Promotor, der in Melanomzellen aktiv ist und in einer Studie an das Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-tk) -Suizidgen gekoppelt wurde. Man injizierte anschließend retrovirale Vektoren, denen diese Genkassette eingebaut wurde, in die Schwanzvene von Mäusen, die ein metastasierendes Melanom in sich trugen. Nach systemischer Verabreichung der nicht-toxischen Vorläufersubstanz Ganciclovir, die vom HSV-tk-Genprodukt in ihre aktive, toxische Form (phosphoryliertes Ganciclovir) umgewandelt wird, trat ein therapeutischer Effekt ein (Vile et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde tmTNF als therapeutisches Gen nicht unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert. Die selektive Infektion von Tumorzellen und Tumorendothelzellen sollte allein durch die lokale, intratumorale Injektion der retroviralen Vektoren erzielt werden. Zum Nachweis des exprimierten tmTNF im Tumorgewebe mittels indirekter Immunfluoreszens wurde eine Chimäre des humanen TNF-Rezeptors I mit dem FcTeil des humanen IgG eingesetzt, die murines TNF-Protein in der löslichen und membranstädigen Form bindet.

Clauss et al. (2001) konnten bereits zeigen, dass im Tumorendothel einiger unbehandelter Meth-A-Sarkome endogen tmTNF exprimiert wird. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (vgl. 3.3.1). Bei 22 von 30 untersuchten Meth-A-Sarkomen konnte unabhängig vom Tumoralter TNF detektiert werden. Der Vergleich zwischen den imunhistologischen TNF- und PECAM-1-Färbungen zeigte deutlich, dass die TNF-Expression endothelialen Ursprungs war. Die Tatsache, dass TNF endogen in den Endothelzellen unbehandelter Meth-A-Sarkome exprimiert wird, erschwerte die immunhistologische Auswertung der mit Re.tmTNF behandelten Tumoren. Es konnte nämlich nicht unterschieden werden, ob immunhistologisch detektiertes TNF eine Folge erfolgreicher Integration und Expression des viralen Genoms oder endogenen Ursprungs war. Es wurde deshalb geprüft, ob in den mit Re.tmTNF behandelten Tumoren eine signifikant gesteigerte Anzahl von TNF-postiven Tumoren und/oder eine erhöhte Expressionsstärke gefunden werden konnte, um dadurch auf eine erfolgreiche Integration des retroviralen Genoms schließen zu können.

Zunächst wurde untersucht, ob eine intratumorale Injektion von Re.tmTNF in Meth-A-Sarkomen zu einer erkennbar gesteigerten Expression von TNF in diesen Tumoren führte (vgl. 3.3.2). Tatsächlich konnte in allen Tumoren, die intratumoral entweder mit Re.tmTNF oder sTNF behandelt wurden, schwache oder starke TNF-Expression nachgewiesen werden. Bei den Tieren, denen intratumoral das Kontrollvirus Re.pBabeNeo injiziert wurde, fand sich lediglich bei einem der drei Tumoren eine schwache Expression von TNF. Ähnlich verhielt es sich, als B16-Melanom-tragenden Mäusen intratumoral Re.tmTNF bzw. Re.pBabeNeo und anschließend intraperitoneal sTNF behandelt wurden, konnte in den Tumoren eine schwache bis starke Expression von TNF detektiert werden, wohingegen nur sechs der neun mit Re.pBabeNeo behandelten Tumoren schwach TNF-positiv waren. Die intraperitoneale Verabreichung von sTNF blieb ohne Einfluss auf die TNF-Detektion in den Tumoren. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der für den Nachweis von TNF eingesetzte Antikörper (TNFRI/Fc) TNF als lösliche und membranständige Form bindet, jedoch nicht sTNF, das rezeptorgebunden an der Zelloberfläche sitzt (Gerspaech et al., 2000).

In allen anderen Versuchen, bei denen Mäuse mit einer Kombinationstherapie aus Re.tmTNF und TNF behandelt wurden, konnte nach der Injektion von Re.tmTNF keine verstärkte TNF-Expression beobachtet werden. Stets war unabhängig von der Therapie in den meisten Tumoren eine Expression von TNF zu finden, die in den mit Re.tmTNF behandelten Tumoren auch nicht erkennbar stärker ausfiel. Insgesamt erwies sich die semiquantitative Auswertung der TNF-Expression mittels indirekter Immunfluoreszenz als unbefriedigend, da hiermit lediglich die Präsens von TNF nachgewiesen werden kann. Jedoch beweist diese Methode nicht, dass eine erfolgreiche Integration des therapeutischen Gens in das Genom der Zielzelle stattgefunden hat. Zusätzlich unterliegt die Angabe über die Stärke der Expression zum Teil der Interpretation des Auswertenden. Alternativ könnte eine *in situ*-Hybridisierung durchgeführt werden, bei der es möglich ist, zelluläre mRNA im Gewebe direkt zu detektieren. Diese Methode basiert auf der spezifischen Hybridisierung einer radioaktiv markierten Nukleinsäure-Sonde mit der komplementären zellulären RNA. Dadurch könnten Transkripte des therapeutischen Gens in mit dem retroviralen Vektor infizierten Zellen identifiziert werden.

4.4.2 Einfluss der retroviralen Gentherapie mit tmTNF auf die Tumorvaskularisierung

Das Meth-A-Sarkom ist das klassische Beispiel eines TNF-sensitiven Tumors. Dabei stellt in erster Linie das Gefäßsystem dieses Tumors, das sich verglichen mit anderen Tumormodellen durch eine gesteigerte Gefäßpermeabilität und ein aktiviertes Tumorendothel auszeichnet, einen Angriffspunkt für TNF dar (Watanabe et al., 1988; Van de Wiel et al., 1989).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Darstellung der Tumorgefäße stets mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem gegen den Endothelzellmarker PECAM-1 gerichteten Antikörper. Um bei nachfolgenden Versuchen die Morphologie des Gefäßsystems therapierter Tumoren besser beurteilen zu können, wurde zunächst das Gefäßsystem von unbehandelten Meth-A-Sarkomen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation der Tumorzellen untersucht (vgl. 3.3.1). Dabei war zu beobachten, dass sich die Tumorgefäße im Verlauf des Tumorwachstums immer stärker verzweigten. Jedoch nahmen die Gefäßdurchmesser erheblich ab, so dass der Gesamtquerschnitt der Tumorgefäße einen immer geringeren Anteil am Tumorquerschnitt einnahm. Dies läßt sich dadurch erklären, dass bei der Tumorangiogenese initial eine Vasodilatation der Gefäße erfolgt. Gleichzeitig kommt es zu einer VEGF-vermittelten gesteigerten Durchlässigkeit der Endothelzellen. Der Anstieg der vaskulären Permeabilität führt zu einem Austritt von Plasmaproteinen ins Gewebe, die wandernden Endothelzellen als Matrix dienen. Anschließend kommt es durch Sprossung und Intussuszeption zur Ausbildung eines immer feineren Tumorgefäßnetzes (Abb.3.6 B, D, F, H).

Die pluripotente Wirkung von TNF lässt sich auch in seiner Wirkung auf Endothelzellen und die Gefäßbildung bei wachsenden Tumoren beobachten. Während einige Studien darauf hindeuten, dass TNF zum Teil durch Modulation des VEGF-spezifischen angiogenen Signalweges durch Herabregulation von VEGF-Rezeptoren in HUVEC einen antiangiogenen Effekt ausübt (Peterson et al., 1996), scheint TNF auf der anderen Seite unter bestimmten Umständen *in vivo* indirekt angiogen zu wirken (Montrucchio et al., 1994). Ob therapeutisch appliziertes TNF *in vivo* angiogen oder antiangiogen wirkt, ist daher nicht völlig vorhersehbar.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich in der Mehrzahl der *in vivo*-Versuche nach Therapie mit Re.tmTNF bzw. sTNF kein Effekt auf die Tumorvaskularisierung beobachten. Mikroskopisch wiesen diese Tumoren, verglichen mit den unbehandelten Kontrolltumoren, keinen Unterschied in der Gefäßdichte auf. Ein gewisser Effekt zeigte sich lediglich als Meth-A-Sarkom-tragenden Mäusen intratumoral Re.tmTNF bzw. Re.pBabeNeo und anschließend intraperitoneal sTNF bzw. PBS injiziert wurde (vgl. 3.3.4). Hierbei hatte die Kombinationstherapie von Re.tmTNF und sTNF eine hemmende Wirkung auf die Tumorvaskularisierung verglichen mit den anderen Therapien. Dieser Effekt ließ sich jedoch nicht beobachten, als Mäusen nach intratumoraler Vorbehandlung mit Re.tmTNF ebenfalls intratumoral sTNF appliziert wurde (vgl. 3.3.3). Hier waren bei der Betrachtung der Tumorvaskularisierung keine Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppen zu sehen.

Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass TNF systemisch appliziert indirekt über die Induktion antiangiogener Faktoren die Angiogenese hemmt. Es ist jedoch auch denkbar, dass TNF seinen antiangiogenen Effekt nur intravasal entfalten kann und nicht wenn es paravasal direkt in den Tumor injiziert wird. Hierbei kommt es eher zur direkten Schädigung von Tumorgewebe mit anschließender Ausbildung von Nekrosen (vgl. 3.3.3).

Ebenfalls bewirkte die intratumorale Re.tmTNF-Injektion bei Mäusen mit B16-Melanomen weder eine Hemmung noch eine Förderung der Tumorgefäßbildung (vgl. 3.3.5). Auch die zusätzliche intraperitoneale Verabreichung von sTNF zeigte hier keinen Effekt auf die Gefäßdichte in den Melanomen (vgl. 3.3.6).

4.4.3 Einfluss der retroviralen Gentherapie mit tmTNF auf die Ausbildung von Tumornekrosen

TNF wirkt zum einen direkt zytotoxisch auf Tumorzellen, zum anderen löst es durch Induktion von Thrombosen, Blutungen und gesteigerter Gefäßpermeabilität hämorrhagische Nekrosen aus (Watanabe et al., 1988).

Zunächst wurde untersucht, ob durch retroviralen Gentransfer im Tumorendothel exprimiertes nicht prozessierbares tmTNF durch seine koagulations- und permeabilitätsfördernde Wirkung indirekt zu Tumornekrose führt. Es zeigte sich, dass die intratumorale Injektion von Re.tmTNF in Meth A Tumor-tragende Mäuse bei der Hälfte der Tiere die Ausbildung von zentralen Tumornekrosen induzierte (vgl. 3.3.2; 3.3.3). Dagegen blieben alle Tumoren, die mit dem Kontrollvirus Re.pBabeNeo behandelt wurden, frei von Nekrosen. Deutlicher war der Befund nach einer zusätzlichen intratumoralen sTNF-Injektion 48 h nach der intratumoralen Vorbehandlung mit Re.tmTNF. Hier fanden sich bei allen Tumoren, die mit Re.tmTNF und sTNF behandelt wurden, große zentrale Nekrosen. In der Gruppe, der nach intratumoraler Injektion des Kontrollvirus Re.pBabeNeo systemisch sTNF appliziert wurde, ließ nur einer der drei untersuchten Tumoren nekrotische Areale erkennen. Offensichtlich konnte das auf den Endothelzellen exprimierte tmTNF das Tumorendothel für eine folgende sTNF-Therapie sensibilisieren. Durch das tmTNF wurde möglicherweise nicht nur die indirekte tumornekrotisierende Wirkung von sTNF durch Induktion gesteigerter intravasaler Koagulationsbereitschaft und Erhöhung der Gefäßpermeabilität potenziert. Vermutlich konnte das injizierte sTNF durch die bereits entstandenen Gefäßschädigungen direkt ins Tumorstroma eindringen, wo es seine zytotoxische Wirkung entfaltete.

Diese synergistische tumornekrotisierende Wirkung von gentherapeutisch exprimiertem tmTNF und injiziertem sTNF war nicht zu beobachten als sTNF nach intratumoraler Vorbehandlung mit Re.tmTNF systemisch (intraperitoneal) verabreicht wurde (vgl. 3.3.4). Bei diesem Versuch konnte die sytemische Injektion von sTNF nach intratumoraler Vorbehandlung mit pBabeNeo bei zwei der drei untersuchten Tumoren Nekrosen induzieren. Hingegen waren alle Mäuse, die nach intratumoraler Re.tmTNF-Applikation eine intraperitoneale sTNF-Injektion erhielten, frei von Tumornekrosen. Auch alle Tumoren, die sytemisch mit PBS behandelt wurden, blieben ohne Nekrosen.

Hier wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass Re.tmTNF am Ort der Injektion nicht nur Tumorzellnekrosen induziert, sondern auch zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität führt, was wiederum das Eindringen des systemisch applizierten sTNF in das Tumorinterstitium erleichtern und somit einen zusätzlichen antitumoralen Effekt herverufen sollte.

Die Tatsache, dass die intratumorale Verabreichung von Re.tmTNF nicht wie erwartet bei allen Tumoren Nekrosen induzierte, könnte an einem Behandlungsfehler liegen, wenn die retroviralen Vektoren aus technischen Gründen nicht direkt intra-, sondern paratumoral appliziert wurden.

In den nachfolgenden Versuchen wurden ähnliche Therapiestrategien am Modell des B16-Melanoms durchgeführt. Bei einer Patientenstudie von Leujeune et al. (1995) konnte mittels isolierter Extremitätenperfusion (vgl. 1.3.3.1) bei Patienten mit Melanom-*in-transit*-Metastasen durch die Kombinationstherapie aus TNF, einem Zytostatikum, Interferon- γ und Hyperthermie bei über 90 % der Patienten eine komplette Tumorregression erzielt werden. Auch andere Studien demonstrierten die Sensitivität von malignen Melanomen gegenüber TNF.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass schon die alleinige Injektion von retroviralen Vektoren, unabhängig davon ob der Vektor für tmTNF kodierte oder nicht, Tumornekrosen in B16-Melanomen induzierte (vgl. 3.3.5). Hierfür könnten die physikalischen Kräfte verantwortlich sein, die bei der Injektion der Retroviren entstehen. Eine zelluläre Immunabwehrreaktion, die zur Abtötung der mit viralen Partikeln infizierten Zellen führte, ist bei lokaler Applikation der Retroviren eher unwahrscheinlich. Bei der Kombinationstherapie mit intratumoraler Injektion des retroviralen Vektors und anschließender intraperitonealer Gabe von sTNF löste auch die systemische Gabe von sTNF bei allen Tumoren Nekrosen aus. In der Gruppe, in der die Mäuse die Kombination Re.tmTNF/PBS erhielten, fanden sich in drei von fünf Tumoren Nekrosen. Wider Erwartung konnte die intratumorale Gabe des Kontrollvirus in dieser Versuchsreihe in keinem der fünf Tumoren Nekrosen induzieren, wenn eine systemische Gabe von PBS folgte. Vermutlich war es nicht gelungen, die Viren direkt intratumoral zu applizieren.

4.4.4 Einfluss der retroviralen Gentherapie mit tmTNF kombiniert mit Melphalan auf das Tumorwachstum

Bei einigen *in vivo*-Studien konnten Synergismen in der antitumoralen Wirkung von TNF und Melphalan demonstriert werden (Manusama et al., 1996a; 1996b; Nooijen et al., 1996). Die Tatsache, dass dieser Synergismus *in vitro* nicht beobachtet werden konnte, deutet darauf hin, dass die antitumorale Wirkung *in vivo* auf indirekte Mechanismen, wie die Steigerung der Gefäßpermeabilität oder die Aktivierung des Immunsystems beruhen.

Um zu ermitteln in welchen Dosen Melphalan im Meth A Tumormodell wachstumshemmend wirkt, wurde Melphalan in steigenden Dosen angefangen bei 1 mg bis 10 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal in tumortragende Mäuse injiziert. Die antineoplastische Wirkung von Melphalan erfolgt durch Alkylierung von Nukleinsäuren. Dieser zytotoxische Effekt macht sich während der DNS-Synthese bemerkbar. Es war daher zu erwarten, dass Melphalan nicht nur auf die Tumorzellen hemmend wirken würde, sondern auch auf die Tumorendothelzellen, die während der Tumorangiogenese stark proliferieren. Die systemische Verabreichung von Melphalan zeigte jedoch nur in der höchsten Dosis (10 mg pro kg Körpergewicht) einen leichten antiangiogenen Effekt (vgl. 3.3.7). Die Wirkung auf das Tumorwachstum war hingegen relativ deutlich. Die Tumoren, die mit einer Dosis von 5 mg Melphalan pro kg Körpergewicht therapiert wurden, wogen im Durchschnitt 33 % weniger als die mit PBS behandelten Kontrolltumoren. Bei den mit 10 mg behandelten Tumoren war das Tumorgewicht im Durchschnitt sogar 44 % geringer. Allerdings waren bei den Mäusen dieser Gruppe auch schwere Nebenwirkungen in Form von Kopfhaarverlust bei zwei Tieren zu beobachten.

Im nächsten Experiment sollte geprüft werden, ob die observierte tumorhemmende Wirkung von Melphalan durch die gentherapeutische Vorbehandlung der Tumoren mit Re.tmTNF verstärkt werden kann (vgl. 3.3.8). Es wurde erwartet, dass die antivaskuläre Aktivität von TNF durch die Induktion von Entzündungsreaktionen und Hyperpermeabilität in den Tumorgefäßen, die Verteilung von Melphalan im Tumorgewebe erleichtern würde.

Es zeigte sich jedoch, dass die systemische Applikation von 5 mg Melphalan pro kg Körpergewicht, unabhängig davon, ob die Tumoren mit Re.tmTNF oder Re.pBabeNeo vorbehandelt wurden, keine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum hatte. Eine geringe tumorhemmende Wirkung hatte allerdings die gentherapeutische Behandlung der Tumoren mit Re.tmTNF. Während die Tumoren, die mit dem Kontrollvirus behandelt wurden, im Durchschnitt um 315 % an Größe zunahmen, lag die Größenzunahme der mit Re.tmTNF behandelte Tumoren durchschnittlich lediglich bei 240 %. Dennoch blieb der synergistische tumorhemmende Effekt zwischen TNF und Melphalan aus. Selbst die wachstumshemmende Wirkung von 5 mg pro kg sytemisch appliziertem Melphalan, wie sie im vorherigen Versuch zu beobachten war, konnte hier nicht bestätigt werden.

In verschiedenen Studien demonstrierte die Kombinationstherapie aus Melphalan und TNF bei der isolierten Extremitätenperfusion signifikante Erfolge in der Behandlung von Weichteilsarkomen (Schraffordt et al., 1998). Dies erklärt man vor allem mit der durch TNF induzierten Gefäßpermeabilität, die der zytostatischen Substanz Melphalan das Eindringen ins

Tumorgewebe erleichtert. Die synergistische Wirkung von TNF und Melphalan erfolgt dabei im wesentlichen durch indirekte antitumorale Effekte wie der Zerstörung von Tumorgefäßen und der konsekutiven erhöhten Wirksamkeit von Melphalan. Neben seiner alkylierenden Aktivität führt Melphalan über Vernetzung der DNS-Stränge und Veränderung der Purinbasen der DNS zur Störung des Zellmetabolismus und Behinderung der Verdoppelung der DNS in der S-Phase.

Warum Melphalan in diesem Experiment keine tumorhemmende Wirkung zeigte ist unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass das verwendete Melphalan durch falsche Lagerung inaktiv war. Leider bestand aus organisatorischen Gründen keine Möglichkeit dieses Experiment zu wiederholen.

4.5 Die Bedeutung der Gentherapie in der Behandlung von Tumoren

Da die Behandlung einer Krebserkrankung meist ein langwieriges Geschehen darstellt, ist der Einsatz der Gentherapie durch ihre Fähigkeit hohe therapeutische Titer kontrolliert über einen langen Zeitraum zu erhalten, eine attraktive Behandlungsmethode. In den vergangenen Jahren wurden viele neue Strategien zur Therapie solider Tumoren mittels Gentransfer entwickelt. Die drei wichtigsten Ansätze sind die Tumorsuppressorgen-Therapie, die Suizidgen-Therapie und die Immunmodulationsgentherapie. Durch eine antiangiogene Gentherapie könnten die Nebenwirkungen, die bei der traditionellen Tumortherapie durch Bestrahlung und dem Einsatz von Zytostatika oftmals unumgänglich sind, verringert oder sogar beseitigt werden. Zur Zeit wird antiangiogene Gentherapie vor allem mit den endothelzellspezifischen und antiangiogenen Molekülen Endostatin und Angiostatin durchgeführt. Für Endostatin kodierende adenovirale Vektoren, die über einen Zeitraum von zwei Wochen systemisch verabreicht wurden, hemmten in einer Studie signifikant das Wachstum von Nierentumoren und Lungenkarzinomen in Mäusen (Blezinger et al., 1999). Auch die intravenöse Injektionen von Plasmid-Liposom-Komplexen, die Endostatin und Angiostatin exprimierten, zeigten eine effektive Tumorhemmung bei Brustkrebs (Chen et al., 1999). Als sehr effektiv in der Hemmung von Tumorwachstum erwies sich ebenfalls die Kombination von Bestrahlung und Angiostatin-Gentherapie im Gliomamodell (Griscelli et al., 2000). Solche synergistischen Effekte sind vielfach beschrieben, der Wirkmechanismus ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Da p53, das in Zellen eine wichtige Rolle bei der Transkription, DNS-Reparation, Apoptose und Angiogenese spielt, das Gen ist, das in menschlichen Tumoren am häufigsten mutiert ist,

erlangte es eine große Bedeutung in der Tumorgentherapie. Die Transduktion von Krebszellen mit p53 kann nicht nur das Wachstum und die Angiogenese signifikant hemmen, sondern induziert auch in zahlreichen Tumormodellen Apoptose in p53-defizienten Zellen (Fujiwara et al., 1994; Lesoon-Wood et al., 1995; Xu et al., 1997). In der Phase I der klinischen Erprobung gelang es sogar durch Injektion eines retroviralen Vektors, das für p53 kodierte, bei 6 von 9 Patienten mit Lungentumoren das Tumorwachstum zu hemmen (Roth et al., 1996). Dennoch ist die Tumorsuppressorgen-Therapie durch den Mangel an identifizierten Tumorgenen limitiert. Hinzu kommt, dass die völlige Regression behandelter Tumoren nur selten erfolgt, da es meist nicht gelingt, eine ausreichend hohe Anzahl von Zellen im Tumor zu transfizieren.

Ein anderer Ansatz in der Tumorgentherapie ist die *in vivo*-Transfektion mit für toxische Substanzen kodierenden Genen. In der vorliegenden Arbeit gelang es mittels gentherapeutischer Behandlung mit für tmTNF kodierenden retroviralen Vektoren in Meth-A-Sarkomen Tumornekrosen zu induzieren. Trotz deutlicher Fortschritte in der Tumorgentherapie existieren noch einige ungelöste Probleme. Die Entwicklung effektiverer Methoden, um die gewebespezifische Infektion zu gewährleisten, bleibt ein Hauptziel in der Gentherapie. Dazu wurden bereits eine Anzahl Zelloberflächenrezeptoren untersucht und verschiedene Ansätze zur Modifikation vorgeformter Virionen und zur Pseudotypisierung viraler Partikel weiterentwickelt. In den wenigen Fällen, in denen eine Transfektion gelang, waren die Infektionsraten meist sehr niedrig.

Ein weiteres Problem der systemischen Gentherapie ist die Inaktivierung retroviraler Vektoren durch das Immunsystem, besonders durch das Komplementsystem (Welsh et al., 1975). Die Inaktivierung hängt dabei vom Retrovirus und von der Zelle, die das Virus produziert, ab. Von Mauszellen erzeugtes MLV wird eher inaktiviert als MLV, das von menschlichen Zellen produziert wird (Takeuchi et al., 1994). Daher sollte es möglich sein, durch bestimmte Kombinationen von Viren und Verpackungszellen humanen Ursprungs Vektoren herzustellen, die eine hohe Resistenz gegenüber Komplementinaktivierung aufweisen. Ein anderer Weg wäre, monoklonale Antikörper, die bestimmte Komponenten des Komplementsystems blockieren, einzusetzen (Panthier et al., 1989).

Zusammenfassend ist die Gentherapie für der Behandlung von Tumorerkrankungen ein vielversprechender Ansatz. Sie kann dabei alleine eingesetzt werden oder in der Kombination mit traditionellen Therapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie.
5 Zusammenfassung

Obwohl zahlreiche *in vitro-* und *in vivo-*Studien die antitumorale Eigenschaft von TNF demonstrierten, wird die klinische Anwendung von TNF in der Therapie von Krebserkrankungen durch die bei systemischer Verabreichung auftretenden erheblichen Nebenwirkungen und die verhältnismäßig niedrigen Ansprechraten der Tumoren limitiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde an den Tumormodellen des Meth-A-Sarkoms und des B16-Melanoms die Wirkung der gentherapeutischen Tumorbehandlung mit membranständigem Tumornekrosefaktor (tmTNF) auf die Tumorzellen und auf das Tumorendothel untersucht. Hierzu wurde der für die cDNA von tmTNF kodierende retrovirale Vektor pBabe Neo verwendet. Da für eine effiziente Infektion der Zielzellen ein hoher viraler Titer notwendig ist, wurden die Retroviren zunächst mittels Zentrifugation konzentriert.

In vivo konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Injektion des für tmTNF kodierenden retroviralen Vektors in Meth A Fibrosarkomen die Ausbildung von Tumornekrosen induziert. Nach Injektion eines Kontrollvirus, das nicht für tmTNF kodierte, fanden sich hingegen keine Tumornekrosen.

Anschließend wurde geprüft, ob die intratumorale Injektion des Viruskonzentrates die tumornekrotisierende Wirkung von nachfolgend systemisch verabreichtem TNF potenzieren kann. Die antitumorale Wirkung des therapeutischen Gens wurde dabei durch die anschließende intratumorale Injektion, jedoch nicht durch eine systemische Verabreichung, von löslichem TNF (sTNF) verstärkt. In B16-Melanomen induzierte bereits die alleinige intratumorale Injektion von Retroviren, unabhängig davon, ob die Retroviren für tmTNF kodierten oder nicht, die Entstehung von Tumornekrosen. Durch die nachfolgende systemische Applikation von sTNF konnte kein zusätzlicher tumornekrotisierender Effekt erzielt werden.

Abschließend wurde am Meth-A-Sarkom untersucht, ob die gentherapeutische Vorbehandlung des Tumorendothels mit tmTNF die antineoplastische Wirkung des Zytostatikums Melphalan potenzieren kann. Es stellte sich heraus, dass die intratumorale Behandlung der Tumoren mit dem für tmTNF kodierenden Virus eine leichte wachstumshemmende Wirkung auf die Tumoren hatte. Die Wachstumshemmung wurde durch die anschließende systemische Behandlung mit Melphalan jedoch nicht verstärkt.

6 Summary

Although numerous *in vitro-* and *in vivo-*studies have demonstrated the antitumoral property of TNF, the clinical use of TNF in the therapy of cancer is limited by the severe side effects and the relatively low response of the tumors to therapy when administered systemically.

In this study, the effect of gene therapeutic tumor therapy with transmembrane tumor necrosis factor (tmTNF) in tumor cells and tumor endothelium was determined in the meth A sarcoma and the B16-Melanoma tumor models. To this effect, the cDNA of the retroviral vector pBabe Neo encoding tmTNF was used. As a high viral titer is necessary for efficient infection of the target cells, the retroviruses were concentrated by centrifugation.

In vivo results showed that the intratumoral injection of the retroviral vector encoding tmTNF induced tumor necrosis in meth A sarcoma. However, no tumor necrosis was detected after injection of a control virus not encoding tmTNF.

Furthermore, tests were carried out to determine whether the intratumoral injection of the concentrated virus is able to intensify the antitumoral effect of subsequent, systemically injected TNF. Results obtained demonstrated that the antitumoral effect of the therapeutic gene was increased by subsequent intratumoral injection, but not by systemic treatment with soluble TNF (sTNF). In B16-Melanoma, even the sole intratumoral injection of the retrovirus induced tumor necrosis, regardless of whether or not the Retroviruses encoded tmTNF. Subsequent, systemic administration of sTNF had no additional effect on tumor necrosis.

Finally, an investigation was conducted to determine whether the gene therapeutic pretreatment of the tumor endothelium with tmTNF is capable of enhancing the antineoplastic effect of the cytostatic drug Melphalan in meth A sarcoma. The findings revealed that the intratumoral treatment of the tumors with the virus encoding tmTNF had a slight growth-retarding effect. However, growth inhibition was not intensified by subsequent systemic treatment with Melphalan.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AIDS	Immundefektsyndrom
	-
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	Kolonie-bildende Einheiten
CS	Kälberserum
Cv3	Indocarbocvanin
-) -	
DNS	Desoxvribonukleinsäure
$DMEM^+$	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium mit 4.5 g/l Glukose
DMSO	Dimethylsulfoxid
Diffe	Dinionyiounoma
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EMAP	endotheliales Monozyten-aktivierendes Polypentid
env	virales Hüllprotein (envelone)
CIIV	vitules fruipfotein (envelope)
FACS	Fluorescent-Activated Cell Sorting
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flb 1	Fatale Laber Kinase 1
1°1K-1	Petale Leber-Killase-1
σ	Gramm [.] Erdbeschleunigung (9.81m/s ²)
5 ogo	grunnensnezifisches Antigen
Gln	Glutamin
OIII	Giumini
HIF-1α	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 α
HIV	humanes Immundefizienzvirus
hu	human
HIVEC	humana Nabalsabnurvananandotbalzallan
IIU VEC	numane Nabelsennurvenenendotneizenen
IFNγ	Interferon-v
IgG	Immunglobulin G
IKB	Inhibitor κ B
II	Interleukin
in	intraperitoneal
i.h.	intraportioneal
1.l.	muatumora

KS	Kälberserum
LPS	Lipopolysaccharide (Endotoxin)
М	molar
m	Meter
mAK	monoklonaler Antikörper
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCP-1	Monozyten-attrahierendes Protein-1
Meth A	Methylcholanthren A
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLV	Maus-Leukämie-Virus
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mu	murin
ΝFκB	Nuklearer Faktor κ B
nm	Nanometer
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PDGF	Plättchen-vermittelter Wachstumsfaktor
PECAM-1	Plättchen-Endothelzelladhäsionsmolekül-1
PF-4	Plättchenfaktor-4
рН	pondus hydrogenii
pol	Polymerasekomplex mit reverser Transkriptase
P/S	Penicillin-Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasen-Kettenreaktion
sec	Sekunde(n)
S.O.	siehe oben
sTNF	löslicher Tumornekrosefaktor
Tab.	Tabelle
TACE	TNFα -konvertierendes Enzym
TAPI	TNFα Protease-Inhibitor
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween 20
TBSA	Tris-gepufferte Salzlösung mit 1 % (w/v) Rinderserumalbumin
TESPA	3' Aminopropyltrimethoxysilan
TF	Gewebsthromboplastin (tissue factor)

TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor-β
Tie	Tyrosinkinase mit Ig- und EGF-Domänen
tmTNF	Transmembranes Tumornekrosefaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
TNS	Tumornekroseserum
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Einheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VEGF	Vaskulärer Endothelzell-Wachstumsfaktor
w/v	Gewicht/Volumen

8 Literaturverzeichnis

Adams, R. M., Wang, M., Steffen, D. and Ledley, F. D. (1995). Infection by retroviral vectors outside of their host range in the presence of replication-defective adenovirus. *J Virol* 69, 1887-94.

Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V. and Harkins, R. N. (1985). Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* **260**, 2345-54.

Arora, N., Masood, R., Zheng, T., Cai, J., Smith, D. L. and Gill, P. S. (1999). Vascular endothelial growth factor chimeric toxin is highly active against endothelial cells. *Cancer Res* 59, 183-8.

Barnes, P. J., Haddad, E. B. and Rousell, J. (1997). Regulation of muscarinic M2 receptors. *Life Sci* 60, 1015-21.

Beutler, B. A., Milsark, I. W. and Cerami, A. (1985). Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol* 135, 3972-7.

Blezinger, P., Wang, J., Gondo, M., Quezada, A., Mehrens, D., French, M., Singhal, A., Sullivan, S., Rolland, A., Ralston, R. et al. (1999). Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Nat Biotechnol* **17**, 343-8.

Boris-Lawrie, K. and Temin, H. M. (1994). The retroviral vector. Replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* **716**, 59-70; discussion 71.

Bowles, N. E., Eisensmith, R. C., Mohuiddin, R., Pyron, M. and Woo, S. L. (1996). A simple and efficient method for the concentration and purification of recombinant retrovirus for increased hepatocyte transduction in vivo. *Hum Gene Ther* 7, 1735-42.

Brown, J. M. and Giaccia, A. J. (1998). The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 58, 1408-16.

Camerini, D., Walz, G., Loenen, W. A., Borst, J. and Seed, B. (1991). The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol* 147, 3165-9.

Carmeliet, P., Moons, L. and Collen, D. (1998). Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res* **39**, 8-33.

Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-70.

Cepko, C. L. (1989). Immortalization of neural cells via retrovirus-mediated oncogene transduction. *Annu Rev Neurosci* 12, 47-65.

Chen, Q. R., Kumar, D., Stass, S. A. and Mixson, A. J. (1999). Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res* **59**, 3308-12.

Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, M. and Ruggiero, M. (1998). Oncogenes, p53, and tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* **124**, 523-5.

Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P. C., Pan, Y. C., Olander, J. V., Connolly, D. T. and Stern, D. (1990a). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* **172**, 1535-45.

Clauss, M., Grell, M., Fangmann, C., Fiers, W., Scheurich, P. and Risau, W. (1996). Synergistic induction of endothelial tissue factor by tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor: functional analysis of the tumor necrosis factor receptors. *FEBS Lett* **390**, 334-8. Clauss, M., Murray, J. C., Vianna, M., de Waal, R., Thurston, G., Nawroth, P., Gerlach, H., Bach, R., Familletti, P. C. and Stern, D. (1990b). A polypeptide factor produced by fibrosarcoma cells that induces endothelial tissue factor and enhances the procoagulant response to tumor necrosis factor/cachectin. *J Biol Chem* **265**, 7078-83.

Clauss, M., Sunderkotter, C., Sveinbjornsson, B., Hippenstiel, S., Willuweit, A., Marino, M., Haas, E., Seljelid, R., Scheurich, P., Suttorp, N. et al. (2001). A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. *Blood* 97, 1321-9.

Contrino, J., Hair, G., Kreutzer, D. L. and Rickles, F. R. (1996). In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* **2**, 209-15.

Creasey, A. A., Reynolds, M. T. and Laird, W. (1986). Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 46, 5687-90.

Decoster, E., Vanhaesebroeck, B., Vandenabeele, P., Grooten, J. and Fiers, W. (1995). Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **270**, 18473-8.

Dembic, Z., Loetscher, H., Gubler, U., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M. and Lesslauer, W. (1990). Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* **2**, 231-7.

Denekamp, J. (1984). Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol* **23**, 217-25.

Duh, E. J., Maury, W. J., Folks, T. M., Fauci, A. S. and Rabson, A. B. (1989). Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci US A* **86**, 5974-8.

Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Berse, B., Brown, L. F., Yeo, K. T., Yeo, T. K., Dvorak, A. M., van de Water, L., Sioussat, T. M. and Senger, D. R. (1992). Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. *Ann N Y Acad Sci* 667, 101-11.

Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Feng, D., Brown, L. F. and Dvorak, A. M. (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **237**, 97-132.

Falcone, D. J., McCaffrey, T. A., Haimovitz-Friedman, A. and Garcia, M. (1993). Transforming growth factor-beta 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* **155**, 595-605.

Folkman, J. (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175, 409-16.

Folkman, J. (1985). Tumor angiogenesis. Advances in Cancer Research 43, 175-203.

Folkman, J. (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res* **46**, 467-73.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.

Folkman, J. (1997). Addressing tumor blood vessels. Nat Biotechnol 15, 510.

Fraker, D. L. and Alexander, H. R. (1994). Isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor for extremity melanoma and sarcoma. *Important Adv Oncol*, 179-92.

Frisch, S. M. (1994). E1a induces the expression of epithelial characteristics. *J Cell Biol* 127, 1085-96.

Fujiwara, T., Grimm, E. A., Mukhopadhyay, T., Zhang, W. W., Owen-Schaub, L. B. and Roth, J. A. (1994). Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Res* **54**, 2287-91.

Fushimi, K., Torigoe, K., Yamauchi, H., Furusako, S., Kurimoto, M. and Namba, M. (1998). Establishment of a human fibroblast cell line producing tumor necrosis factor alpha (KMST-6/TNF) and growth inhibitory effects of its conditioned medium on malignant cells in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **34**, 463-7.

Gasparini, G., Toi, M., Miceli, R., Vermeulen, P. B., Dittadi, R., Biganzoli, E., Morabito, A., Fanelli, M., Gatti, C., Suzuki, H. et al. (1999). Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am* **5**, 101-11.

Gerspach, J., Gotz, A., Zimmermann, G., Kolle, C., Bottinger, H. and Grell, M. (2000). Detection of membrane-bound tumor necrosis factor (TNF): an analysis of TNF-specific reagents. *Microsc Res Tech* **50**, 243-50.

Gonzalez, M. V., Gonzalez-Sancho, J. M., Caelles, C., Munoz, A. and Jimenez, B. (1999). Hormone-activated nuclear receptors inhibit the stimulation of the JNK and ERK signalling pathways in endothelial cells. *FEBS Lett* **459**, 272-6.

Goodwin, R. G., Anderson, D., Jerzy, R., Davis, T., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Smith, C. A. (1991). Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* **11**, 3020-6.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**, 793-802.

Grell, M., Zimmermann, G., Gottfried, E., Chen, C. M., Grunwald, U., Huang, D. C., Wu Lee, Y. H., Durkop, H., Engelmann, H., Scheurich, P. et al. (1999). Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *Embo J* 18, 3034-43.

Griscelli, F., Li, H., Cheong, C., Opolon, P., Bennaceur-Griscelli, A., Vassal, G., Soria, J., Soria, C., Lu, H., Perricaudet, M. et al. (2000). Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6698-703.

Haranaka, K., Satomi, N. and Sakurai, A. (1984). Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int J Cancer* **34**, 263-7.

Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J. W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R. K. and McDonald, D. M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* **156**, 1363-80.

Havell, E. A., Fiers, W. and North, R. J. (1988). The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J Exp Med* **167**, 1067-85.

Heller, R. A., Song, K., Fan, N. and Chang, D. J. (1992). The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* **70**, 47-56.

Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. and Jain, R. K. (1997). Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* **3**, 177-82.

Hideshima, T., Akiyama, M., Hayashi, T., Richardson, P., Schlossman, R., Chauhan, D. and Anderson, K. C. (2003). Targeting p38 MAPK inhibits multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu. *Blood* **101**, 703-5.

Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P. and Jain, R. K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4607-12.

Horak, E. R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniewska, K. and Harris, A. L. (1992). Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* **340**, 1120-4.

Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V. and Goeddel, D. V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**, 387-96.

Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504.

Im, S. A., Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., Liu, T. J., Ke, L. D., Kim, J. S., Lee, H. Y., Steck, P. A., Kyritsis, A. P. and Yung, W. K. (1999). Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res* **59**, 895-900.

Itoh, Y., Kohgo, Y., Watanabe, N., Kanisawa, Y., Sakamaki, S., Takahashi, M., Hirayama, Y., Ono, H., Himeno, T. and Niitsu, Y. (1991). Human tumor-infiltrating lymphocytes transfected with tumor necrosis factor gene could augment cytotoxicity to autologous tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 82, 1203-6.

Jain, R. K. (1997). Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 26, 71-90.

Jain, R. K., Koenig, G. C., Dellian, M., Fukumura, D., Munn, L. L. and Melder, R. J. (1996). Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 15, 195-204.

Jiang, X., Huang, X. and Li, J. (1997). [The correlation between tumor angiogenesis and lymph node metastasis in primary breast carcinoma]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* **35**, 583-5.

Kao, J., Houck, K., Fan, Y., Haehnel, I., Libutti, S. K., Kayton, M. L., Grikscheit, T.,
Chabot, J., Nowygrod, R., Greenberg, S. et al. (1994). Characterization of a novel tumorderived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. *J Biol Chem* 269, 25106-19.

Kao, J., Ryan, J., Brett, G., Chen, J., Shen, H., Fan, Y. G., Godman, G., Familletti, P. C.,
Wang, F., Pan, Y. C. et al. (1992). Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem* 267, 20239-47.

Kawai, T., Satomi, N., Sato, N., Sakurai, A., Haranaka, K., Goto, T. and Suzuki, M. (1987). Effects of tumor necrosis factor (TNF) on transplanted tumors induced by methylcholanthrene in mice. A histopathologic study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **52**, 489-500.

Klagsbrun, M. and Moses, M. A. (1999). Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 6, R217-24.
Koch, A. E., Cho, M., Burrows, J. C., Polverini, P. J. and Leibovich, S. J. (1992).
Inhibition of production of monocyte/macrophage-derived angiogenic activity by oxygen free-radical scavengers. *Cell Biol Int Rep* 16, 415-25.

Lejeune, F., Lienard, D., Eggermont, A., Schraffordt Koops, H., Kroon, B., Gerain, J., Rosenkaimer, F. and Schmitz, P. (1994). Clinical experience with high-dose tumor necrosis factor alpha in regional therapy of advanced melanoma. *Circ Shock* **43**, 191-7.

Lejeune, F., Lienard, D., Eggermont, A., Schraffordt Koops, H., Rosenkaimer, F., Gerain, J., Klaase, J., Kroon, B. and Schmitz, P. (1995). [Efficacy of the tumor necrosis factor-alpha (rTNF-alpha) associated with interferon-gamma and chemotherapy in extracorporeal circulation in the limb in inoperable malignant melanoma, soft tissue sarcoma and epidermoid carcinoma. A 4-year experience]. *Bull Cancer* **82**, 561-7.

Lejeune, F. J. (1997). The management of malignant melanoma revisited. *Acta Chir Belg* 97, 209-14.

Lentz, S. S., McKean, D. J., Kovach, J. S. and Podratz, K. C. (1989). Phenotypic and functional characteristics of mononuclear cells in ovarian carcinoma tumors. *Gynecol Oncol* 34, 136-40.

Lesoon-Wood, L. A., Kim, W. H., Kleinman, H. K., Weintraub, B. D. and Mixson, A. J. (1995). Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice. *Hum Gene Ther* **6**, 395-405.

Lewis, M., Tartaglia, L. A., Lee, A., Bennett, G. L., Rice, G. C., Wong, G. H., Chen, E. Y. and Goeddel, D. V. (1991). Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2830-4.

Loetscher, H., Schlaeger, E. J., Lahm, H. W., Pan, Y. C., Lesslauer, W. and Brockhaus, M. (1990). Purification and partial amino acid sequence analysis of two distinct tumor necrosis factor receptors from HL60 cells. *J Biol Chem* **265**, 20131-8.

Manda, T., Shimomura, K., Mukumoto, S., Kobayashi, K., Mizota, T., Hirai, O., Matsumoto, S., Oku, T., Nishigaki, F., Mori, J. et al. (1987). Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: evidence of an indirect mode of antitumor activity. *Cancer Res* 47, 3707-11.

Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S. and Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* **13**, 265-70.

Mantovani, A., Sozzani, S. and Introna, M. (1997). Endothelial activation by cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 832, 93-116.

Manusama, E. R., Nooijen, P. T., Stavast, J., Durante, N. M., Marquet, R. L. and Eggermont, A. M. (1996a). Synergistic antitumour effect of recombinant human tumour necrosis factor alpha with melphalan in isolated limb perfusion in the rat. *Br J Surg* 83, 551-5.

Manusama, E. R., Stavast, J., Durante, N. M., Marquet, R. L. and Eggermont, A. M. (1996b). Isolated limb perfusion with TNF alpha and melphalan in a rat osteosarcoma model: a new anti-tumour approach. *Eur J Surg Oncol* **22**, 152-7.

Markowitz, D., Goff, S. and Bank, A. (1988). Construction of a safe and efficient retrovirus packaging cell line. *Adv Exp Med Biol* 241, 35-40.

Marvin, M. R., Libutti, S. K., Kayton, M., Kao, J., Hayward, J., Grikscheit, T., Fan, Y., Brett, J., Weinberg, A., Nowygrod, R. et al. (1996). A novel tumor-derived mediator that sensitizes cytokine-resistant tumors to tumor necrosis factor. *J Surg Res* 63, 248-55.

Matschurat, S., Knies, U. E., Person, V., Fink, L., Stoelcker, B., Ebenebe, C., Behrensdorf, H. A., Schaper, J. and Clauss, M. (2003). Regulation of EMAP II by hypoxia. *Am J Pathol* 162, 93-103.

Mechtcheriakova, D., Schabbauer, G., Lucerna, M., Clauss, M., De Martin, R., Binder, B. R. and Hofer, E. (2001). Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF-alpha signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. *Faseb J* 15, 230-242.

Miller, A. D. (1992). Human gene therapy comes of age. Nature 357, 455-60.

Molema, G., de Leij, L. F. and Meijer, D. K. (1997). Tumor vascular endothelium: barrier or target in tumor directed drug delivery and immunotherapy. *Pharm Res* 14, 2-10.

Montrucchio, G., Lupia, E., Battaglia, E., Passerini, G., Bussolino, F., Emanuelli, G. and Camussi, G. (1994). Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis. *J Exp Med* **180**, 377-82.

Moolten, F. L. (1994). Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther* **1**, 279-87.

Moore, B. B., Keane, M. P., Addison, C. L., Arenberg, D. A. and Strieter, R. M. (1998). CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J Investig Med* **46**, 113-20.

Moore, K. L., Esmon, C. T. and Esmon, N. L. (1989). Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood* **73**, 159-65.

Morgenstern, J. P. and Land, H. (1990). A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res* 18, 1068.

Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. Science 260, 926-32.

Nawroth, P., Handley, D., Matsueda, G., De Waal, R., Gerlach, H., Blohm, D. and Stern, D. (1988). Tumor necrosis factor/cachectin-induced intravascular fibrin formation in meth A fibrosarcomas. *J Exp Med* 168, 637-47.

Nawroth, P. P., Bank, I., Handley, D., Cassimeris, J., Chess, L. and Stern, D. (1986). Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Exp Med* **163**, 1363-75.

Nawroth, P. P. and Stern, D. M. (1986). Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 163, 740-5.

Nguyen, N. M., Lehr, J. E. and Pienta, K. J. (1993). Pentosan inhibits angiogenesis in vitro and suppresses prostate tumor growth in vivo. *Anticancer Res* 13, 2143-7.

Nooijen, P. T., Manusama, E. R., Eggermont, A. M., Schalkwijk, L., Stavast, J., Marquet, R. L., de Waal, R. M. and Ruiter, D. J. (1996). Synergistic effects of TNF-alpha and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological, immunohistochemical and electron microscopical study. *Br J Cancer* 74, 1908-15.

North, R. J. and Havell, E. A. (1988). The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF) II. Analysis of the role of endogenous TNF in endotoxin-induced hemorrhagic necrosis and regression of an established sarcoma. *J Exp Med* **167**, 1086-99.

Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194, 23-8.

Nowell, W. R. (1996). Possible introduction of Aedes albopictus into Texas from Vietnam. J Am Mosq Control Assoc 12, 743-4.

Ogawa, M., Umehara, K., Yu, W. G., Uekusa, Y., Nakajima, C., Tsujimura, T., Kubo, T., Fujiwara, H. and Hamaoka, T. (1999). A critical role for a peritumoral stromal reaction in the induction of T-cell migration responsible for interleukin-12-induced tumor regression. *Cancer Res* **59**, 1531-8.

Pahl, H. L. and Baeuerle, P. A. (1996). Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca2+ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett* **392**, 129-36.

Palladino, M. A., Jr., Patton, J. S., Figari, I. S. and Shalaby, M. R. (1987). Possible relationships between in vivo antitumour activity and toxicity of tumour necrosis factor-alpha. *Ciba Found Symp* **131**, 21-38.

Panthier, J. J., Gounon, P., Condamine, H. and Jacob, F. (1989). Pattern of expression of ecotropic murine leukemia virus in gonads of inoculated SWR/J mice. *J Virol* 63, 2134-42.

Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B. and Goeddel, D. V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724-9.

Pepper, M. S. (1997). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**, 21-43.

Perez, C., Albert, I., DeFay, K., Zachariades, N., Gooding, L. and Kriegler, M. (1990). A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* **63**, 251-8.

84

Pintavorn, P. and Ballermann, B. J. (1997). TGF-beta and the endothelium during immune injury. *Kidney Int* **51**, 1401-12.

Plate, K. H., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A. and Risau, W. (1993). Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* **53**, 5822-7.

Renard, N., Lafage-Pochitaloff, M., Durand, I., Duvert, V., Coignet, L., Banchereau, J. and Saeland, S. (1996). Demonstration of functional CD40 in B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells in response to T-cell CD40 ligand. *Blood* 87, 5162-70.

Rosenfeld, M. A., Siegfried, W., Yoshimura, K., Yoneyama, K., Fukayama, M., Stier, L. E., Paakko, P. K., Gilardi, P., Stratford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M. et al. (1991). Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science* 252, 431-4.

Roth, J. A., Nguyen, D., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Carrasco, C. H., Ferson, D. Z., Hong, W. K., Komaki, R., Lee, J. J., Nesbitt, J. C. et al. (1996). Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* **2**, 985-91.

Saijonmaa, O., Nyman, T. and Fyhrquist, F. (2001). Downregulation of angiotensinconverting enzyme by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in cultured human endothelial cells. *J Vasc Res* **38**, 370-8.

Schoenfeld, H. J., Poeschl, B., Frey, J. R., Loetscher, H., Hunziker, W., Lustig, A. and Zulauf, M. (1991). Efficient purification of recombinant human tumor necrosis factor beta from Escherichia coli yields biologically active protein with a trimeric structure that binds to both tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem* **266**, 3863-9.

Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S. and Dvorak, H.
F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-5.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-5.

Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S.
K., Cosman, D. and Goodwin, R. G. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248, 1019-23.

Smyth, J. F., Mossman, J., Hall, R., Hepburn, S., Pinkerton, R., Richards, M., Thatcher,
N. and Box, J. (1994). Conducting clinical research in the new NHS: the model of cancer.
United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research. *Bmj* 309, 457-61.

Springer, G. F., Desai, P. R., Tegtmeyer, H., Carlstedt, S. C. and Scanlon, E. F. (1994). T/Tn antigen vaccine is effective and safe in preventing recurrence of advanced human breast carcinoma. *Cancer Biother* **9**, 7-15.

Staba, M. J., Mauceri, H. J., Kufe, D. W., Hallahan, D. E. and Weichselbaum, R. R. (1998). Adenoviral TNF-alpha gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft. *Gene Ther* **5**, 293-300.

Stern, R. S. (1986). PUVA carcinogenesis after ten years: prospect and retrospect. *Photodermatol* **3**, 257-60.

Takeuchi, Y., Cosset, F. L., Lachmann, P. J., Okada, H., Weiss, R. A. and Collins, M. K. (1994). Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* **68**, 8001-7.

Tanaka, S., Takahashi, T., Takayanagi, H., Miyazaki, T., Oda, H., Nakamura, K., Hirai,
H. and Kurokawa, T. (1998a). Modulation of osteoclast function by adenovirus vectorinduced epidermal growth factor receptor. *J Bone Miner Res* 13, 1714-20.

Tanaka, T., Cao, Y., Folkman, J. and Fine, H. A. (1998b). Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res* 58, 3362-9.

Tartaglia, L. A., Pennica, D. and Goeddel, D. V. (1993a). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* **268**, 18542-8.

Tartaglia, L. A., Rothe, M., Hu, Y. F. and Goeddel, D. V. (1993b). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* **73**, 213-6.

Temin, H. M. (1990). Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. *Hum Gene Ther* 1, 111-23.

Tomazic, V. J., Farha, M., Loftus, A. and Elias, E. G. (1988). Anti-tumor activity of recombinant tumor necrosis factor on mouse fibrosarcoma in vivo and in vitro. *J Immunol* **140**, 4056-61.

Tracy, T. S. and Black, C. D. (1987). Calcium modulators: future agents, future uses. *Drug Intell Clin Pharm* 21, 575-83.

Van de Wiel, P. A., Bloksma, N., Kuper, C. F., Hofhuis, F. M. and Willers, J. M. (1989). Macroscopic and microscopic early effects of tumour necrosis factor on murine Meth A sarcoma, and relation to curative activity. *J Pathol* **157**, 65-73.

Van Ostade, X., Van der Heyden, J., Verhee, A., Vandekerckhove, J. and Tavernier, J. (1999). The cell surface expression level of the human interleukin-5 receptor alpha subunit determines the agonistic/antagonistic balance of the human interleukin-5 E13Q mutein. *Eur J Biochem* **259**, 954-60.

Vile, R. and Russell, S. J. (1994). Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. *Gene Ther* **1**, 88-98.

Watanabe, N., Niitsu, Y., Umeno, H., Sone, H., Neda, H., Yamauchi, N., Maeda, M. and Urushizaki, I. (1988). Synergistic cytotoxic and antitumor effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia. *Cancer Res* **48**, 650-3.

Weber, C. (1996). Involvement of tyrosine phosphorylation in endothelial adhesion molecule induction. *Immunol Res* **15**, 30-7.

Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R. and Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* **324**, 1-8.

Weinberg, R. A. (1996). The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol Ther* **2**, 105-10.

Welsh, R. M., Jr., Cooper, N. R., Jensen, F. C. and Oldstone, M. B. (1975). Human serum lyses RNA tumour viruses. *Nature* 257, 612-4.

Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresh, D. A. and Nemerow, G. R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**, 309-19.

Wingfield, P., Pain, R. H. and Craig, S. (1987). Tumour necrosis factor is a compact trimer. *FEBS Lett* **211**, 179-84.

Worrall, N. K., Chang, K., LeJeune, W. S., Misko, T. P., Sullivan, P. M., Ferguson, T.
B., Jr. and Williamson, J. R. (1997). TNF-alpha causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol* 273, H2565-74.

Xu, M., Kumar, D., Srinivas, S., Detolla, L. J., Yu, S. F., Stass, S. A. and Mixson, A. J. (1997). Parenteral gene therapy with p53 inhibits human breast tumors in vivo through a bystander mechanism without evidence of toxicity. *Hum Gene Ther* **8**, 177-85.

Yi, E. S. and Ulich, T. R. (1992). Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules. *Am J Pathol* 140, 659-63.

Zamkoff, K. W., Newman, N. B., Rudolph, A. R., Young, J. and Poiesz, B. J. (1989). A phase I trial of subcutaneously administered recombination tumor necrosis factor to patients with advanced malignancy. *J Biol Response Mod* **8**, 539-52.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Dr. Matthias Clauss für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, der Bereitstellung optimaler Forschungsbedingungen und die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit. Seine sehr menschliche und frische Art verbunden mit hoher fachlicher Kompetenz machten ihn zum perfekten Doktorvater.

Dr. Andreas Hilbig danke ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die verschiedenen Methoden meiner Doktorarbeit, für die Überlassung einiger Zelllinien, ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre und dafür, dass er mir stets fachlich und vor allem freundschaftlich zur Seite stand.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Carmen Fangmann, Levent Kanal, Dr. Susanne Matschurat, Rita Mitnacht-Kraus, Anja Reitz und Dr. Antje Willuweit für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima im Labor.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung "Molekulare Zellbiologie" für die vielfache Hilfe bedanken.

Besonderer Dank gilt an dieser Stelle Dr. Katja Ißbrücker, die mich stets geduldig und kompetent bei allen kleineren und größeren Problemen, die während meiner Arbeit auftraten, unterstützte. Unendlich danke ich ihr auch für die zahlreichen Ratschläge und Inspirationen bei der Korrektur meiner Manusskripte.

Dr. Andreas Gaumann danke ich sehr für die Einführung in die histologische Pathologie und für die große Hilfe bei der Auswertung von Tumorpräparaten.

Bei Dr. Felix Müller-Holtkamp möchte ich mich für die sichere Führung durch das undurchsichtige Gewirr der Computerwelt bedanken.

Ein großes Dankeschön richte ich auch an das Team des Tierstalls für die sehr gute Zusammenarbeit.

Dank auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich uneingeschränkt während der Durchführung der Doktorarbeit unterstützt und ermutigt haben.

Besonders danke ich meiner lieben Mutter, die mir das Studium ermöglicht und diese Arbeit Korrektur las.

9.2 Lebenslauf

Persönlich Angaben

Geburtsdatum	10. Mai 1978
Geburtsort	Zaria in Nigeria
Familienstand	ledig

Schulausbildung

Aug 1984 – Apr 1987	Grundschule in Zaria / Nigeria
Apr 1987 – Jul 1988	Grundschule in Bad König
Aug 1988 – Jul 1990	Förderstufe in Bad König
Aug 1990 – Jun 1997	Gymnasium in Michelstadt
Jun 1997	Abitur

Universitätsausbildung

Okt 1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-
	Universität in Gießen
Okt 1998 – Jul 1999	Tutor der Lehrveranstaltung "Demonstration der Anatomie" am
	Institut für Anatomie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
Sep 1999	Ärztliche Vorprüfung
Mär 2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Feb 2000 – Feb 2003	Promotionsarbeit am Max-Planck-Institut für Physiologische und
	Klinische Forschung in Bad Nauheim unter der Leitung von PD Dr.
	Matthias Clauss. Thema: "Gentherapeutischer Einsatz von tmTNF-
	exprimierenden retroviralen Vektoren am Modell des Meth-A-
	Sarkoms und des B16-Melanoms in vivo«
Okt 2001 – Jul 2002	Austauschjahr mit "Erasmus-Stipendium" an der Universität von
	Lausanne, Schweiz
Okt 2002 – Jul 2003	Studentische Hilfskraft am Institut für Physiologie an der Justus-
	Liebig-Universität in Gießen
Sep 2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Nov 2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen

Mär 2000 – Apr 2000	Chirurgie am Kreiskrankenhaus in Erbach
Jul 2000 – Sep 2000	Pädiatrie am Tupua Tamasese Meaole Hospital in Apia, Samoa
Feb 2002 – Mär 2002	Dermatologie am Centre Lémanique de Laser Esthétique in
	Lausanne, Schweiz
Aug 2002 – Sep 2002	Neurologie am Universitätsklinikum in Gießen

Praktisches Jahr

Okt 2003 – Feb 2004	Innere Medizin am Universitätsklinikum in Gießen
Feb 2004 – Jun 2004	Chirurgie am Hôpital Pitié-Salpêtrière in Paris, Frankreich
Jun 2004 – Aug 2004	Pädiatrie am Universitätsklinikum in Genf, Schweiz
Aug 2004 – Sep 2004	Pädiatrie am Universitätsklinikum in Gießen

9.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 31.11.2004